

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Élettani és Biokémiai Tanszék

Nyáry Daniella

**A takarmánykiegészítőként adott
butirát növekedésre és vékonybél-
morfológiára gyakorolt hatásainak
vizsgálata csirkében és patkányban**

Témavezetők: Dr. Mátis Gábor

Dr. Kenéz Ákos

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
Bevezetés és irodalmi áttekintés	4
Célkitűzés.....	10
Anyag és módszer	11
<i>Etetési periódus</i>	11
<i>Mintavételezések</i>	14
<i>Szövettani vizsgálatok</i>	15
<i>A vérplazma vizsgálata</i>	16
<i>Statisztikai analízis</i>	17
Eredmények.....	18
<i>Növekedési erély és takarmányhasznosulás</i>	18
<i>Szövettani vizsgálatok</i>	20
<i>A vérplazma vizsgálata</i>	22
Megbeszélés	24
Összefoglalás.....	27
Summary	28
Köszönetnyilvánítás	29
Irodalomjegyzék.....	30

Rövidítések jegyzéke

ATP = adenzin-trifoszfát

CCPR = crypt cell production rate, kriptasejt produkciós ráta

DE = digestable energy, emészthető energia

DNS = dezoxiribonukleinsav

FCR = feed conversion ratio, relatív takarmányhasznosulás

GALT = gut associated lymphoid tissue

GOD = glükózoxidáz

HDAC = hiszton-deacetiláz

H.E. = hematoxillin-eozin

MÁB = Munkahelyi Állatvédelmi Bizottság

ME = metabolizable energy, metabolizálható energia

PGC-1 α = peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR)- γ koaktivátora,

pKs = savi disszociációs állandó

POD = peroxidáz

PPAR = peroxiszóma proliferátor aktivált receptor

SP1 = *Salmonella* pathogenicity island 1

VFA = volatile fatty acid, illó zsírsav

Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az illó zsírsavak (VFA) az anaerob mikrobiális fermentáció fő végtermékei a kérődzők előgyomraiban, valamint a monogastriкус állatok vastagbelében. Bizonyos VFA-kat viszonylag alacsony koncentrációban, 0,5-2 g/takarmány-kg közt takarmánykiegészítőként is használnak a növekedési erélyt fokozó hatásuk miatt, különösen a nagyüzemi sertés- és baromfitartásban. Elsősorban a butirát, annak is nátrium sója használatos takarmánykiegészítőként napjainkban.

A butirát sejtekre gyakorolt legfőbb hatásai

A mikrobiális fermentáció során keletkező acetát, propionát és butirát együttes koncentrációja a 80-120 mmol/l-t is elérheti a bendőben és a vastagbélben (Bergman, 1990), egymáshoz viszonyított arányuk átlagosan 75:25:10, ezt azonban a takarmányösszetétel jelentősen megváltoztathatja. A VFA-k az emésztőtraktus sejtjeinek jelentős energiaforrásává szolgálnak, nem metabolizálódott hányaduk pedig helyileg hat vagy a portális keringésbe kerül. Biológiai aktivitását, a szervezetre gyakorolt hatásait tekintve a VFA-k közül a butirát bír a legnagyobb jelentőséggel.

Az n-butirát (a továbbiakban: butirát) a négy szénatomot tartalmazó illó zsírsavnak, az n-vajsavnak az anionja. A vajsav jellegzetes szagú, gyenge karbonsav ($pK_s = 4,82$), moláris tömege 88,1 g/mol, olvadáspontja $-7,9\text{ }^{\circ}\text{C}$, forráspontja $163,5\text{ }^{\circ}\text{C}$, sűrűsége 960 kg/m^3 , alkoholban, vízben, éterben egyaránt jól oldódik.

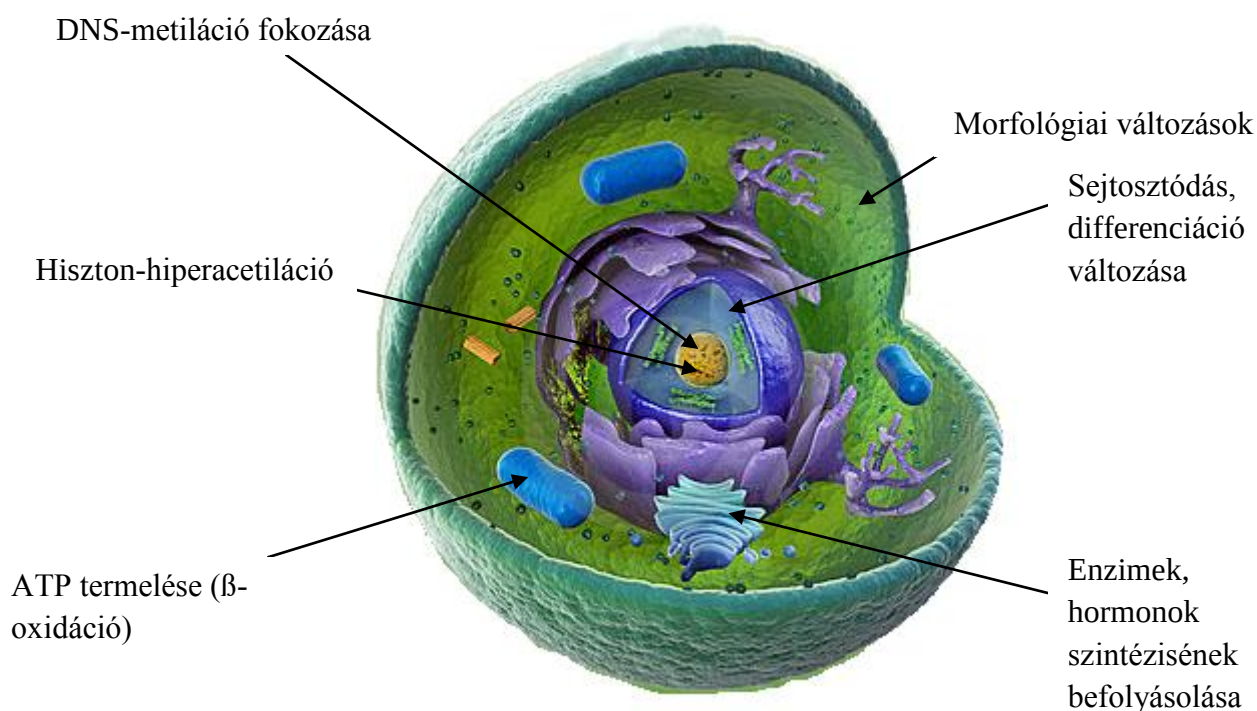
A sejtekbe felvett butirát beléphet a β -oxidációba, melynek során belőle két acetyl-CoA keletkezik, majd ezek a citrátkörbe lépve a légzési lánc és az oxidatív foszforiláció segítségével részt vesznek az ATP-termelésben, és ezáltal befolyásolják a sejt energiaháztartását. A gastrointestinalis hámsejtek, elsősorban a colonocyták legjelentősebb energiaforrása a butirát (Velázquez et al., 1997).

A butirát emellett epigenetikus hatásokkal bír, így hiszton-hiperacetilációt és fokozott DNS-metilációt okozva megváltoztatja bizonyos gének transzkripciós mintázatát, ezáltal módosítja a génexpressziót és befolyásolja egyes enzimek, hormonok szintézisét.

Az aktuális kromatinszerkezet, így a nukleoszómát alkotó hisztonok acetiláltsági foka döntő szerepet játszik a génexpresszió szabályozásában, mivel meghatározza az egyes gének transzkripciós mintázatát, a transzkripciós faktorok hozzáférését a DNS-hez. A hiszton-deacetiláz (HDAC) enzim gátlásával a hisztonok a transzkripcionálisan aktív hiperacetilált állapotba kerülnek, ami bizonyos gének fokozott expresszióját eredményezi (Myzak et al., 2006; Gao et al., 2009).

Az epigenetikus hatások másik jelentős része a DNS promóter régiójának metilációjával áll összefüggésben, melyet a butirát a DNS-metiltranszferáz enzimek aktivitásának fokozásán keresztül idéz elő. Ennek eredményeként az érintett génekről nem történik transzkripció, így kialakul az ún. gene silencing jelensége (Cho et al., 2009).

A sejtre kifejtett főbb hatásokat mutatja be az **1. ábra**.



1. ábra: A butirát sejtre kifejtett főbb hatásai

(<http://www.dreamstime.com/vector-clipart/stock-photography-animal-cell-cut-away-image13626492>, letöltés 2011. okt.31-én)

Mindezen epigenetikus változások miatt a butirátnak a különféle szövetekre és az intermedier anyagcserére különböző hatásai lehetnek. Gao és társai nevéhez (2009) fűződnek azok a vizsgálatok, melyek eredményei szerint a butirát fokozza az inzulinérzékenységet és növeli az energiafelhasználást. A peroxiszóma proliferátor aktivált receptor (PPAR)- γ koaktivátora, a PGC-1 α funkciójának csökkenése maga után vonja a mitokondriális

diszfunkciót, a zsírsavoxidáció csökkenését, és növeli az inzulinrezisztenciát, illetve a II-es típusú diabetes kockázatát. A kísérletben magas zsírtartalmú takarmánnyal etettek egereket. A táp butiráttal való kiegészítésének hatására nőtt a PGC-1 α aktivitása a vázizomban és a barna zsírszövetben, ennek eredményeképp megvédte az állatot a diéta által kiváltott elhízástól, és növelte a zsírsavoxidáció arányát. Emellett a táp okozta inzulinrezisztencia kialakulását is megakadályozta. Az adipocytá differenciációra kifejtett hatást is kimutatták, amelyben szintén a HDAC gátlása játszik szerepet, az adipogén génexpressziót serkentve (Yoo et al., 2006).

A butirát epigenetikus hatásainak következménye a sejtek differenciációját fokozó hatása, ugyanis számos olyan gén átírása kezdődik meg, amelyek a sejtosztódás csökkenését (reverzibilis hatás), a differenciáció fokozódását és egyes esetben a sejt apoptózist (irreverzibilis hatás) okozzák. Sejttenyészetekben a butirát mindig csökkenti a sejtosztódás mértékét, pl. bendőhámsejtek esetében (Gálfi et al., 1981), az *in vivo* kísérletekben ugyanakkor a béltraktus hámsejtjeinek fokozott proliferációját idézi elő. Ez az ellentmondás a butirát ún. *in vivo* paradoxona (Csordás, 1996). Az ellentmondás alapjául szolgálhat, hogy az *in vitro* kísérletekben a tápfolyadék pH-ja 7,2-7,4 között alakul, *in vivo* azonban, a bendőben, illetve vastagbélben a pH ennél sokkal alacsonyabb (Gäbel et al., 1987; Kaufmann et al., 1979). Vizsgálatok bizonyítják, hogy *in vitro* körülmények között a butirát minden eukarióta sejt osztódását gátolja koncentrációfüggő és reverzibilis módon, így kérődzők bendőhámjában a butirátkoncentráció változása alakítja ki a hámsejtek osztódásának napi ritmusát (Gálfi and Neogrady, 2001).

A butirát azon képessége, hogy megakadályozza bizonyos sejtek szaporodását, és fokozza a differenciációt, a terápiás tumorelles szerként való felhasználás lehetőségét is felveti. Specifikus gének expressziójának eredményeképp olyan strukturális és funkcionális elemek termelődnek, amelyek szabályozzák a sejtkapcsolatokat, működést és kommunikációt: tulajdonképpen ezt nevezzük differenciációnak. A HDAC gátlásával ezt befolyásolja a butirát, ezen a mechanizmuson keresztül képes elérni a rákos sejtek, tumorok apoptózist és differenciációját (Csordás, 1996).

A butirát, mint alternatív hozamfokozó

A hozamfokozók olyan takarmánykiegészítő vegyületek, amelyekkel az állatok súlygyarapodása és takarmányértékesítése jelentős mértékben növelhető. Az antibiotikumokat évtizedeken keresztül használták szubterápiás dózisban a takarmányhoz vagy ivóvízhez keverve preventív céllal. A patogén csírák (főleg *Clostridium spp.*) jelentős gyérítésével az antibiotikumok javították a gyarapodási mutatókat. Sajnos a mindennapos alkalmazás miatt a bakteriális rezisztencia nagyfokú terjedése volt megfigyelhető. A humán gyógyászatban használt antibiotikumokkal szembeni gyakori keresztrezisztencia néhány kiemelt kórokozó elleni sikeres kezelést is veszélyeztetett. Mindezek következtében az Európai Unió összes tagállamában az antibiotikumok hozamfokozásra történő alkalmazása 2006. január 1-jétől tilos (Phillips, 2007).

Gálfi és Bokori (1990) írta le, hogy a butirátnak pozitív hatása van a súlygyarapodásra, a takarmányértékesítésre és a bél mikroflórájának összetételére növendék sertésben. A gastrointestinalis mucosa legfontosabb energiaforrása a butirát, itt is elsősorban a colon enterocytái számára, valamint fontos szerepet játszik a gastrointestinalis epithelsejtek proliferációjában és differenciációjában. Hatalmas befolyása van a bél mikroflórájának egyensúlyára az entrális patogén baktériumokra kifejtett szelektív antimikrobiális hatása miatt, így például az *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.* szaporodását szabályozza, ebből kifolyólag hatékony eszköz lehet bizonyos zoonotikus mikrobák visszaszorítására (van Immerseel et al., 2005; Fernández-Rubio et al., 2008). Ennek mechanizmusát a következőképp magyarázzák: a zsírsavak disszociálatlan formában passzív transzporttal könnyen behatolnak a baktériumba. Itt azonban a magasabb intracelluláris pH miatt disszociálódnak, a baktérium plazmáját savanyítva. Russel (1992) szerint elsősorban az anionok kumulációja felelős a szerves savak toxikus hatásáért. Másrésről a felhalmozódó protonokat a baktériumnak aktív transzporttal kell kijuttatnia a sejtből, ez pedig elhasználja a sejt energiáját (Davidson, 2001). Ugyanakkor bizonyos kutatások azt is kimutatták, hogy a mikrobiális génexpresszióra gyakorolt hatása is szerepet játszhat az antimikrobiális funkcióban: *Salmonella* fajok esetében a patogenitásban fontos SPI1 (*Salmonella pathogenicity island 1*) gén expresszióját *in vitro* kísérletekben a butirát negatívan befolyásolta (Gantois et al., 2006).

Emellett a butirát javítja a belek barrier funkcióját azáltal, hogy a tight junction fehérjék expresszióját fokozza (Bordin et al., 2004). A HDAC gátlásával ugyanis megváltozik

a kromatin szerkezete, és bizonyos génszakaszok felszabadulnak a represszorok gátlása alól, ennek következtében pedig a butirát fokozza a cingulin és okkludin (tight junction fehérjék) termelődését *in vitro* kísérletekben. A butirát szükséges a bél által termelt nyirokszövet fejlődéséhez, és növeli az immunreakciót brojler csirkében. Kimutatták, hogy a GALT (gut associated lymphoid tissue, a bélcsatorna immunrendszere) fejlődéséhez is szükséges (Friedman, A. Bar-Shira 2005), ugyanakkor további vizsgálatok alapján bizonyos gyulladáscsökkentő hatása is van a butirátnak (Segain et al., 2000). Többek közt ezen hatások miatt vált ez a VFA érdekessé a baromfi- és sertéstakarmányozásban, különösen azóta, hogy az Európai Unió betiltotta az antibiotikumok hozamfokozóként történő alkalmazását.

Habár a butirátnak egyértelműen pozitív hatása van a növekedési erélyre és a bélrendszer egészségére különböző fajokban, hatásai bizonyos körülmények között változhatnak. Növekvő koncentrációjú (0,5-től 2 g/takarmány-kg) butiráttal dúsított táp brojler csirkében (starter periódus: 0-21 nap) gyorsabb súlygyarapodást és a vékonybélbolyhok hosszának növekedését okozta, valamint javította a takarmányértékesülést (Hu and Guo, 2007). Más vizsgálatok ezzel részben ellentmondó eredményei alapján a butirát alacsonyabb koncentrációja (0,25-1 g/takarmány-kg) nem hat egészséges brojlerekben a starter periódusban a növekedésre, de gyorsabb súlygyarapodást és fokozott takarmányfelvételt eredményez *E. coli* lipopoliszacharid fertőzést követően (Zhang et al., 2011). Rendelkezésünkre állnak olyan irodalmi adatok is, melyek szerint a starter, nevelő és befejező szakaszokban butiráttal kiegészített takarmány nem okozott szignifikáns különbségeket a növekedésben és takarmányértékesítésben, de egyes vékonybélszakaszok hossza szignifikánsan nőtt 3 g/takarmány-kg dózisú tápkiegészítésnél (Mahdavi and Torki, 2009).

Olasz szerzők (Antongiovanni et al., 2007) szignifikáns pozitív hatást figyeltek meg a súlygyarapodásban (ez legkiemelkedőbb a kísérlet első hetében volt) és a relatív takarmányhasznosulásban (FCR, feed conversion ratio) csirkénél butiráttal történő takarmánykiegészítés után, emellett a bélbolyhok hossza csökkent, miközben a kripták mélysége nőtt a jejunumban. Ugyanez a kutatócsoport írta le, hogy a butirát pozitívan hatott a növekedésre *Eimeria* oocystákkal kísérletesen fertőzött, előzőleg nem vakcinázott brojlerekben, tehát felhasználható potenciális coccidiumellenes szerként. A megfigyelés összhangban van további kutatócsoportok eredményeivel, akik igazolták, hogy előzőleg vakcinázott brojlerok coccidiumokkal való fertőzés után fokozódó növekedési erélyt mutattak,

ha butiráttal egészítették ki takarmányukat, ez a hatás azonban nem mutatható ki egészséges madarakban (Leeson et al., 2005).

A takarmánykiegészítőként adott butirát bélmorfológiát befolyásoló hatásairól a fentiekben összefoglalt, részben ellentmondó adatok állnak rendelkezésünkre (Hu and Guo, 2007; Zhang et al., 2011), az esetleges trofikus hatást jellemző paraméterről, az enterocyták méretének alakulásáról azonban nem található irodalmi adat.

A butirátot széles körben alkalmazzák takarmánykiegészítőként emlősöknél is, elsősorban a nagyüzemi sertéstartásban. A patkány a monogastricus emlősök általánosan elfogadott modellállataként szolgálhat, emellett pedig alkalmas a butirát sejtszintű hatásainak vizsgálatára is. Bár sok adat található az irodalmi forrásokban a butirát hatásmechanizmusáról patkányban, kevés információ áll rendelkezésünkre arról, hogyan hat a növekedésre és az intestinalis morfológiára a takarmány butiráttal történő kiegészítése. Sakata (1987) figyelte meg, hogy a butirát a jejunum és a distalis colon kriptasejtjeinek számát is növeli, tehát az epithelialis sejtek száma és abszorpciós képessége is szignifikáns növekedést mutat. Ugyanebben a tanulmányban hasonlította össze az illó zsírsavak hatásait a kriptasejtek osztódására, a CCPR-re (crypt cell production rate). Eszerint a legjelentősebb hatással a butirát, majd a propionát, végül az acetát rendelkezik. Emellett *in vitro* kísérleteket is végzett, ahol azonban a VFA-k negatívan hatottak a CCPR-re.

Ahhoz, hogy a butirát egyes perifériás szövetekre gyakorolt hatását tanulmányozzuk, meg kell vizsgálnunk, hogy a takarmánykiegészítőként adott butirát növeli-e a vérplazma butirátkoncentrációját. Irodalmi adatok szerint az endogén termelődő butirát nem található meg a véráramban a bélfal és a máj intenzív metabolizmusa miatt (Guilloteau et al., 2010). Knudsen et al. (2005) állapították meg, hogy a rozstartalmú takarmány fogyasztása növeli a sertések mesenterialis artériájában a butirát koncentrációját, ami a takarmányfüggő bakteriális butirát-produkcióra vezethető vissza. Tudomásunk szerint igen kevés irodalmi adat áll rendelkezésre a csirkék és a patkányok plazmabutirát-szintjének alakulásáról a takarmány butirátkiegészítését követően.

A szisztémás keringésbe kerülő butirát a sejtek inzulinérzékenységét és glükózfelvételét fokozó, valamint a β -oxidáció intenzitását csökkentő hatásai (Gao et al., 2009) miatt alapvetően befolyásolhatja a szervezet intermedier anyagcseréjét, ezáltal a vérplazma glükóz- és triglicerid-koncentrációját. A takarmányba kevert butirát ilyen hatásairól sem csirkében, sem patkányban nem található irodalmi adat.

Célkitűzés

A butirát, mint takarmánykiegészítő széleskörű irodalommal rendelkezik. Sokrétű ismert hatásai közé tartozik többek közt a növekedésre gyakorolt pozitív hatás, a takarmányértékesülés javítása és a bélflórára gyakorolt előnyös hatásai. Mivel a hagyományos antibakteriális hozamfokozók használatát az EU-ban betiltották, az alternatív hozamfokozók, így a butirát hatásainak vizsgálata ismét az érdeklődés középpontjába került. A szakirodalomban azonban ellentmondó adatokat is találhatunk bizonyos hatások tekintetében. Kutatómunkánk célja néhány ilyen, az irodalmi utalásokban található ellentmondás tisztázása, így például a takarmánykiegészítőként adott butirát (1,5 g/kg táp) növekedési erélyre és takarmányhasznosulásra gyakorolt hatásának vizsgálata brojlersirkében a starter periódus során.

Kutatócsoportunk emellett meg kívánta vizsgálni hisztometriai mérésekkel a jejunum mucosájának feltételezett mikromorfológiai változásait, így a bélbolyhok hosszának, a kripták mélységének és az enterocyták méretének alakulását, mert feltételezhető, hogy a felszívódás befolyásolásán keresztül mindez szerepet játszik a butirát növekedésre gyakorolt pozitív hatásában. Az enterocyták hosszának mérése továbbá azért különösen érdekes, mert segíthet annak tisztázásában, hogy elsősorban hipertrofikus vagy hiperpláziás hatásokat idéz elő a butirát a bélhamban.

Célunk volt továbbá, hogy összehasonlító vizsgálat keretében ezeket a növekedési és bélmorfológiai paramétereket az emlős modellállatként szolgáló patkányban is mérjük, ugyanis a szakirodalomban erre vonatkozóan nem áll rendelkezésünkre adat. A két faj eredményeinek összehasonlításával lehetőségünk nyílik a madarakban és emlősökben kifejtett hatások összevetésére is.

A vérplazma butirát- és acetátkoncentrációját is meg kívántuk határozni, hogy választ kapjunk arra a kérdésre, hogy a takarmánnyal felvett butirát eléri-e a perifériás (extrahepatikus) szöveteket. A plazma glükóz- és triglicerid-koncentrációjának mérésével pedig a butirátnak az intermedier anyagcserére és a szövetek inzulinérzékenységére gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni.

Anyag és módszer

Etetési periódus

A csirke etetési kísérlethez 20 vegyes ivarú, Bábólna Tetra naposcsibéket használtunk fel. Az állatokat a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék állatházában, tízesével, 1,5 m² alapterületű fém ketrecekben, friss faforgácson helyeztük el. Szabályozott megvilágítást alkalmaztunk az alábbiak szerint: 23 óra/nap 0-tól 7 napos korig, 18 óra/nap 8-tól 14 napos korig, 16 óra/nap 15-től 21 napos korig. A teremhőmérsékletet a brojlerek igényeinek megfelelően állítottuk be (az első napokban 30-33°C, később ez 25-26°C-ra csökkent), csakúgy, mint a levegő relatív páratartalmát (35-45%).

Az állatokat a kísérlet kezdetén véletlenszerűen két csoportra bontottuk: 10 csibe alkotta a kontroll csoportot, amelyet starter takarmánnyal etettünk, coccidium-ellenes szerek hozzáadása nélkül (ezek befolyásolhatták volna az állatok növekedését). Tíz brojler takarmányát 1,5 g/kg-os koncentrációban nátrium-butiráttal egészítettük ki. Ezt saját magunk állítottuk elő mindkét kísérleti állatfaj számára 40%-os NaOH-oldat (Reanal) és n-vajsav (Reanal) sztöchiometrikus mennyiségeinek reakciójával. A tútelített oldatból kiváló Na-n-butirátot 5 napig folyamatos ventillációval szárítottuk, majd darálás után a megfelelő koncentrációban a takarmányba kevertük. A takarmány és az ivóvíz mindkét csoport esetében *ad libitum* állt az állatok rendelkezésére.

Az alkalmazott brojlertáp bekeverése Herceghalmon, az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben történt. A takarmány beltartalmi paramétereit az **1. táblázat** mutatja be.

1. táblázat. A brojlersirkék takarmányának beltartalmi értékei

Összetevők	Egység	Kontroll csoport	Butiráttal kiegészített csoport
Szárazanyag	%	88,990	88,860
Nyersfehérje	%	21,220	21,210
Nyerszsír	%	2,945	2,939
Nyersrost	%	2,527	2,525
Nyershamu	%	6,594	6,593
ME	MJ/kg	11,871	11,850
Lizin	%	1,186	1,186
Metionin	%	0,495	0,495
Metionin + cisztein	%	0,858	0,858
Na-butirát	g/kg	0	1,5

A patkány etetési kísérlethez hús, választás utáni öthetes hím Wistar patkányt használtunk fel. Az állatokat az Élettani és Biokémiai Tanszék állatházában kettesével, 0,5 m² alapterületű műanyag ketrecekben, faforgács almon helyeztük el, és szabályozott megvilágítási körülmények (14 óra/nap) között, 22-23°C-os hőmérséklet és 55%-os relatív páratartalom mellett tartottuk őket.

A patkányokat is két csoportra bontottuk: a kontroll állatokat hagyományos, pelletált rágszálótáppal etettük, míg a kísérleti csoport takarmányát nátrium-butiráttal egészítettük ki 1,5 g/takarmány-kg koncentrációban. Ehhez a pelletált tápot először ledaráltuk, majd a nátrium-butiráttal kiegészített takarmányt víz hozzáadásával újraformáztuk és szárítottuk. Az állatokat az ily módon kiegészített táppal etettük *ad libitum*; a kísérlet során az ivóvíz is korlátlanul az állatok rendelkezésére állt. A takarmány beltartalmi értékei megtalálhatók a **2. táblázatban**.

2. táblázat. A patkányok takarmányának beltartalmi értékei

Összetevők	Egység	Kontroll csoport	Butiráttal kieg. Csoport
Szárazanyag	%	88,00	88,00
Nyersfehérje	%	19,90	19,90
Nyerszsír	%	3,61	3,61
Nyersrost	%	4,60	4,60
Nyershamu	%	8,83	8,83
DE	MJ/kg	15,91	15,91
Lizin	%	0,70	0,70
Metionin	%	0,60	0,60
Na-butirát	g/kg	0	1,5

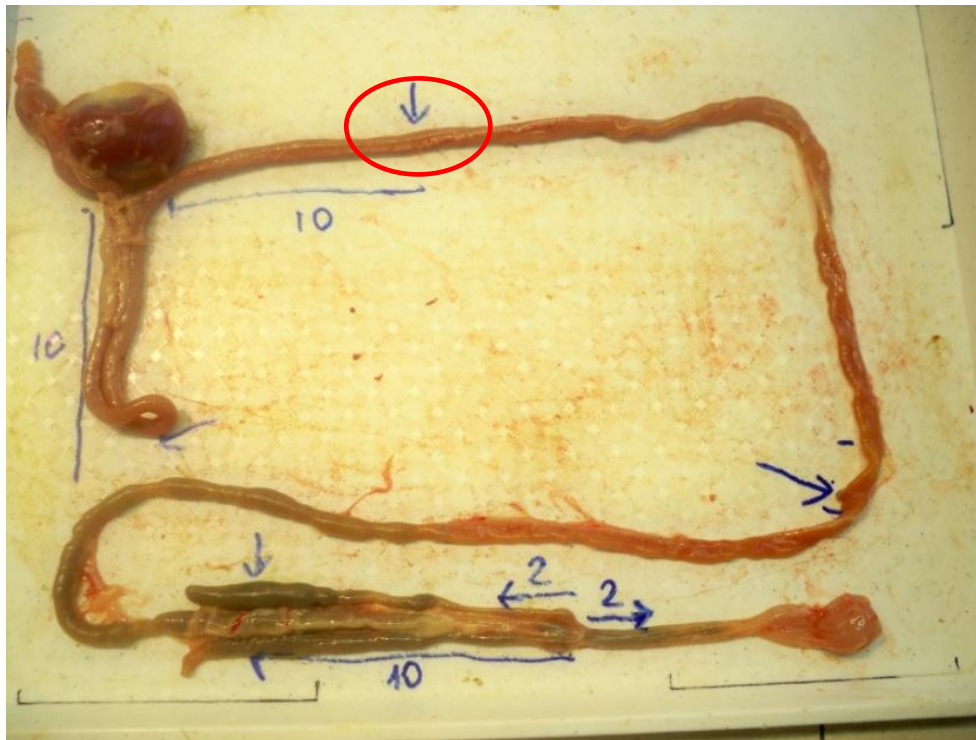
Az állatlétszámot a „3R” szellemében úgy választottuk meg, hogy a lehető legkevesebb kísérleti állatot használjuk fel, az egy csoportba tartozó egyedek száma azonban elég magas legyen ahhoz, hogy eredményeink statisztikailag értékelhetőnek és extrapolálhatónak bizonyuljanak. Az állatkísérleteket a hatályos hazai és uniós állatvédelmi jogszabályok betartásával, a 22.1/4719/003/2008 iktatási számú MÁB keretengedéllyel végeztük.

A csirkék és patkányok testsúlyát egyedenként, a takarmányfelvételt ketrecenként folyamatosan mértük, illetve meghatároztuk a heti súlygyarapodást és a relatív takarmányhasznosulást. A takarmány butirátkoncentrációját a bekeverést követően gázkromatográfiás vizsgálatok segítségével ellenőriztük, a mérésekre az Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézetben (Herceghalom) került sor.

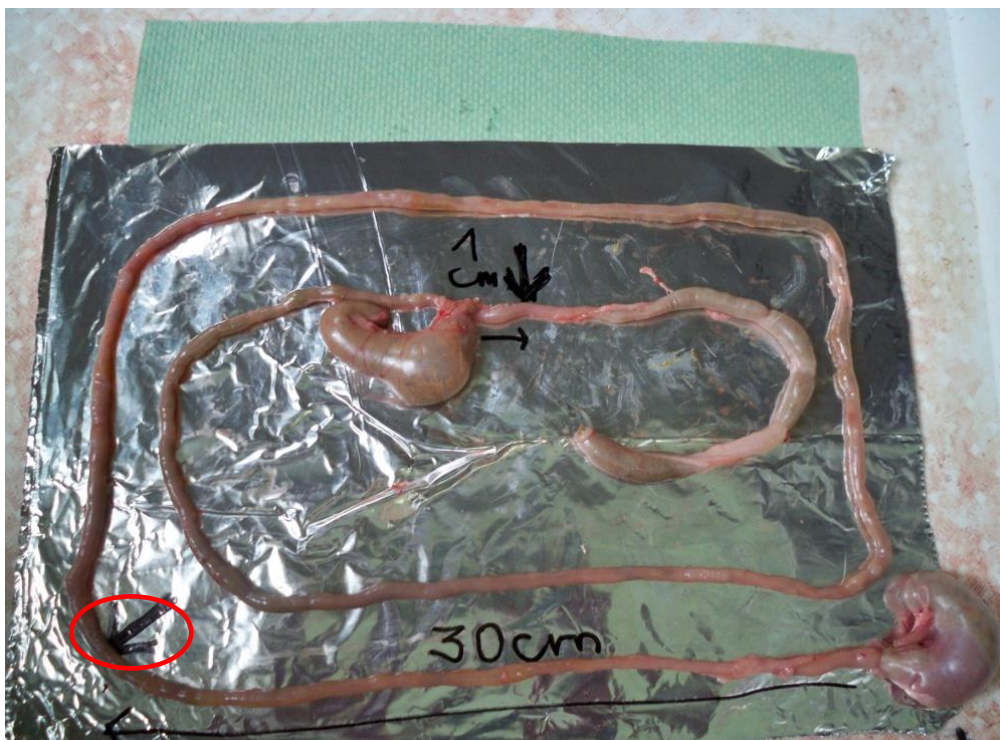
Mintavételezések

A kísérlet 21. napján vérmintavételre került sor: csirkéknél a *vena axillaris*-ból vettünk mintát, míg patkányoknál a dekapitálás során gyűjtöttük a vért. Az alvadásában heparinnal gátolt vérmintákat 200g-n 10 percig centrifugáltuk, majd a plazmát -80°C-on tároltuk további feldolgozásig.

A csirkéket és patkányokat egyaránt szén-dioxidos narkózist követően dekapitáltuk, majd szövettani mintavételekre került sor. A vékonybélmintákat a csirkéknél a jejunum proximális szakaszából vettük, 10 cm-re a *flexura duodenojejunalis*-tól (2. ábra), míg patkányban 30 cm-re a pylorustól metszettük ki (3. ábra).



2. ábra. Jejunum mintavétel helye csirkében



3. ábra. Jejunum mintavétel helye patkányban

Szövetteni vizsgálatok

A szövetmintákat azonnal 10% formalintartalmú PBS-ben fixáltuk, és az általános szövetteni gyakorlatnak megfelelően dolgoztuk fel: fixálás etil-alkohollal, felszálló alkoholsorral víztelenítés, majd paraffinba ágyazás az alkohol eltávolítása után. A paraffinos mintákat ezután xilollal kezeltük, kioldva így a paraffint, majd a xilolt távolítottuk el leszálló alkoholsor segítségével. Desztillált vizes öblítés után a sejtmagokat hematoxilinnal festettük, csapvízzel kékítettük, majd desztillált vízzel öblítettük. A plazmafestés eozinnal történt, ezután szintén desztillált vizes öblítés következett. Felszálló alkoholsorral dehidráltuk a mintákat, majd a derítés és lefedés után készen álltak a vizsgálatra.

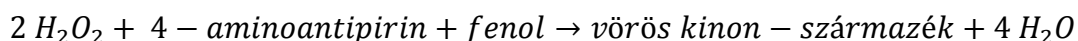
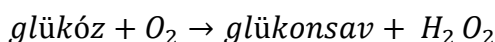
A szövetteni minták vizsgálatához Zeiss „Axiovert 135” optikai mikroszkópot használtunk Canon EOS 40D kamerával. A hisztometriai mérésekhez a Panoramic Viewer 1.14.50 szoftvert használtuk: a bolyhok hosszát (minden állatban 20 boholy), a kripták mélységét (minden állatban 20 kripta) és az enterocyták hosszát (30 sejt állatonként) mértük.

A vérplazma vizsgálata

A vérplazmamintákból gázkromatográfia segítségével határoztuk meg a butirát és az acetát koncentrációját. A gázkromatográfia olyan összetevők szétválasztására és analizálására használható, melyeket el lehet párologtatni bomlástermék nélkül. Technikailag szükséges egy mozgó és egy álló fázis. A mozgó fázis a hordozó gáz, az álló fázis pedig egy semleges szilárd anyagból (üvegből vagy fémből) készült oszlop, amelyre a folyadékot vagy polimert tartalmazó tárgylemezt lehet tenni. Az oszlop fala különféle állófázisokkal van borítva, az anyagokat az ezekkel való kölcsönhatásuk révén tudjuk vizsgálni. A különböző anyagok más-más időegység alatt oldódnak le az adszorbensről; minden anyagnak megvan a specifikus leoldódási ideje. A vajsavnak ismert a leoldódási ideje: hozzávetőleg 7,15 perc.

A vérplazma glükóz- és triglicerid-koncentrációját spektrofotometriás tesztek segítségével határoztuk meg.

A glükózkoncentrációt módosított GOD-POD módszerrel mértük. Ennek működési elve a következő: a glükózoxidáz (GOD) a glükózt glükonsavvá oxidálja. A keletkező H_2O_2 -t a peroxidáz (POD) bontja, a koncentrációt színreagens hozzáadása után fotometrálassal mérjük.



A tesztet Fluitest® GLU kit segítségével végeztük, 37 °C-on, 90 másodperc inkubáció után, 546 nm-es hullámhosszon fotometrálván. A koncentráció a minta és a standard glükózoldat extinkciója alapján meghatározható.

A vérplazma triglicerid-koncentrációját a Triglyceride GPO® kit segítségével határoztuk meg. Ennek működési elve a következő: a reagensben található lipáz hatására a trigliceridek glicerinre és szabad zsírsavakra hidrolizálódnak. A glicerint a glicerin-kináz glicerin-3-foszfáttá alakítja, amit a glicerin-foszfát-oxidáz dihidroxiaceton-foszfáttá oxidál, H_2O_2 keletkezése mellett. Az utolsó, peroxidáz által katalizált lépésben itt is vörös színű, oxidált kinonszármazék keletkezik.

A reakcióelegyet szobahőmérsékleten 15 percig inkubáltuk, majd 505 nm-es hullámhosszon fotometráltuk. A triglicerid-koncentrációt a minta és a standard glükózoldat extinkciója alapján határoztuk meg.

Statisztikai analízis

Az R 2.11.1 szoftvert használtuk fel a kapott adatok kiértékeléséhez. Az adatok eloszlását Shapiro-Wilk-teszttel, illetve hisztogram segítségével ellenőriztük; normális eloszlású alapsokaság esetén Student-féle kétmintás t-próbát végeztünk, kétoldali ellenhipotézis mellett. Nem normális eloszlás esetében Wilcoxon-féle rang-összeg próbával hasonlítottuk össze az egyes csoportok adatait. Szignifikánsnak tekintettük a kontroll csoporthoz viszonyított különbséget, ha $p < 0,05$, illetve nem szignifikáns trendnek, ha $p < 0,10$.

Eredmények

Növekedési erély és takarmányhasznosulás

Vizsgálataink során a takarmány butirátkiegészítése pozitív hatást gyakorolt a brojler csirkék súlygyarapodására, takarmányfelvételére és relatív takarmányhasznosítására: a testsúly szignifikáns ($p < 0,05$) növekedést mutatott a kiegészített táppal etetett csoportban a kontrollhoz képest a teljes vizsgálati periódus alatt. A kísérlet első hetében szignifikánsan megnőtt az állatok takarmányfelvétele és heti súlygyarapodása, valamint csökkent az FCR értéke. Az eredményeket a **3. táblázat** mutatja be.

3. táblázat. A brojlercsirkék növekedési erélyének és takarmányhasznosításának legfőbb paraméterei (átlag $\pm$ szórás, **szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva, $p < 0,05$)

Testsúly (g)		
<i>Kísérlet napja</i>	<i>Kontroll csoport</i>	<i>Butiráttal kiegészített csoport</i>
0	49,60 $\pm$ 2,63	48,90 $\pm$ 3,51
7	124,57 $\pm$ 10,55	157,50 $\pm$ 13,31**
14	303,49 $\pm$ 27,74	334,30 $\pm$ 24,87**
21	636,66 $\pm$ 52,96	666,35 $\pm$ 47,60**
Heti súlygyarapodás (g)		
	<i>Kontroll csoport</i>	<i>Butiráttal kiegészített csoport</i>
0-7	76,53 $\pm$ 2,22	108,60 $\pm$ 2,13**
7-14	178,92 $\pm$ 11,32	176,80 $\pm$ 8,49
14-21	333,17 $\pm$ 17,10	332,05 $\pm$ 13,51
Heti takarmányfelvétel (g)		
	<i>Kontroll csoport</i>	<i>Butiráttal kiegészített csoport</i>
0-7	129,00 $\pm$ 7,23	157,00 $\pm$ 8,55**
7-14	323,75 $\pm$ 33,59	347,50 $\pm$ 34,65
14-21	573,00 $\pm$ 40,09	576,00 $\pm$ 41,23
FCR (relatív takarmányhasznosulás; kg/kg)		
	<i>Kontroll csoport</i>	<i>Butiráttal kiegészített csoport</i>
0-7	1,69 $\pm$ 0,05	1,45 $\pm$ 0,06**
7-14	1,86 $\pm$ 0,24	1,97 $\pm$ 0,09
14-21	1,73 $\pm$ 0,09	1,73 $\pm$ 0,07

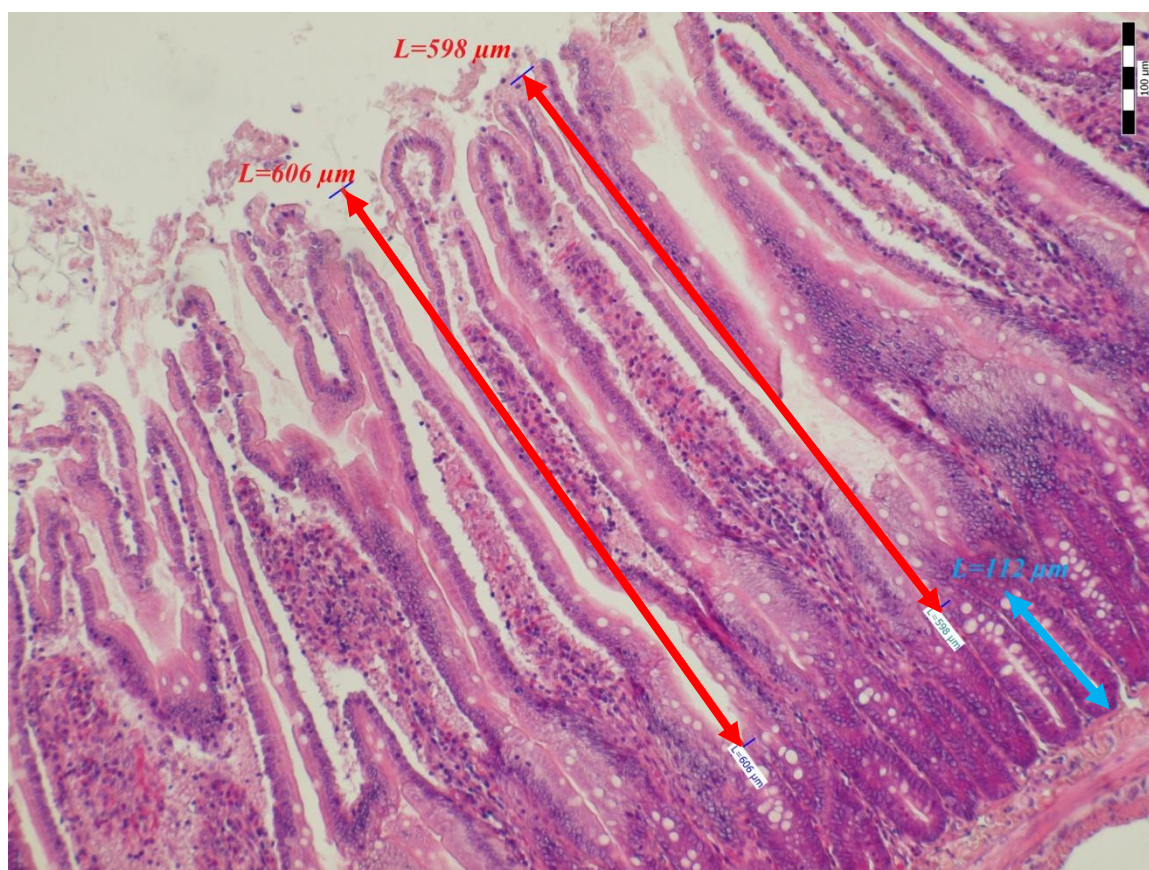
Ezzel szemben a kísérletbe vont, választás utáni patkányokban a butirát nem gyakorolt előnyös hatásokat a növekedésre és takarmányfelvételt. A heti súlygyarapodás kis mértékű, nem szignifikáns növekedést, az FCR pedig csökkenést mutatott ($p < 0,10$) az első hét során a butirátetetés hatására. Meglepő módon a butirátos csoportban a heti súlygyarapodás szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkent a második hét folyamán. Az eredményeket a **4. táblázat** tartalmazza.

4 táblázat. A patkányok növekedési erélyének és takarmányfelhasználásának paraméterei (átlag $\pm$ szórás, *nem szignifikáns trend a kontroll csoporthoz viszonyítva, $p < 0,10$; **szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva, $p < 0,05$)

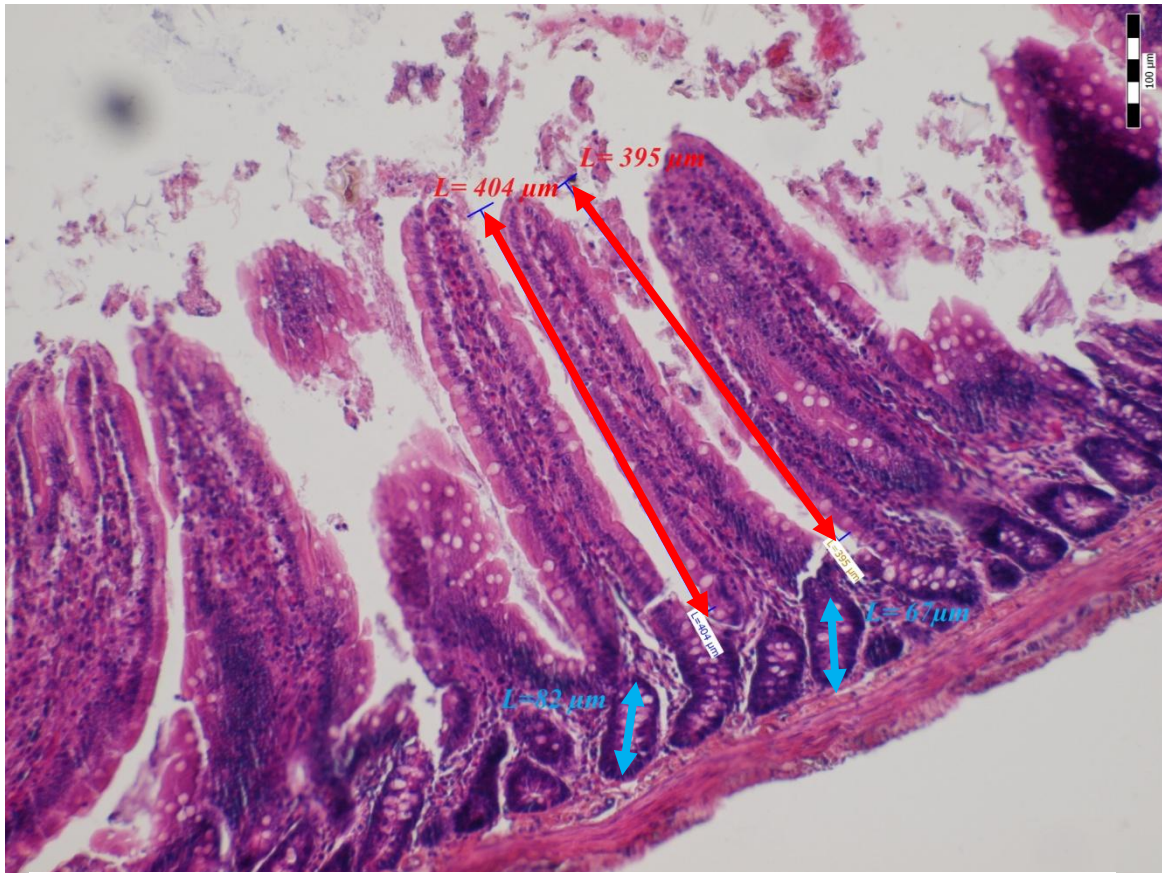
Testsúly (g)		
<i>Kísérlet napja</i>	<i>Kontroll csoport</i>	<i>Butiráttal kiegészített csoport</i>
0	214,50 $\pm$ 16,18	221,50 $\pm$ 24,10
7	276,70 $\pm$ 21,62	288,40 $\pm$ 27,45
14	323,50 $\pm$ 21,56	324,20 $\pm$ 31,82
21	367,10 $\pm$ 23,83	373,30 $\pm$ 3,48
Heti súlygyarapodás (g)		
	<i>Kontroll csoport</i>	<i>Butiráttal kiegészített csoport</i>
0-7	62,20 $\pm$ 8,23	66,90 $\pm$ 8,67*
7-14	46,80 $\pm$ 4,08	35,80 $\pm$ 9,82**
14-21	43,60 $\pm$ 7,00	49,10 $\pm$ 4,77
Heti takarmányfelvétel (g)		
	<i>Kontroll csoport</i>	<i>Butiráttal kiegészített csoport</i>
0-7	242,35 $\pm$ 14,63	225,86 $\pm$ 8,63
7-14	231,43 $\pm$ 19,90	207,37 $\pm$ 10,10
14-21	235,67 $\pm$ 27,39	249,63 $\pm$ 3,22
FCR (relatív takarmányhasznosulás; g/g)		
	<i>Kontroll csoport</i>	<i>Butiráttal kiegészített csoport</i>
0-7	3,87 $\pm$ 0,33	3,39 $\pm$ 0,25*
7-14	4,98 $\pm$ 0,70	5,88 $\pm$ 1,06
14-21	5,37 $\pm$ 0,38	5,11 $\pm$ 0,43

Szövettani vizsgálatok

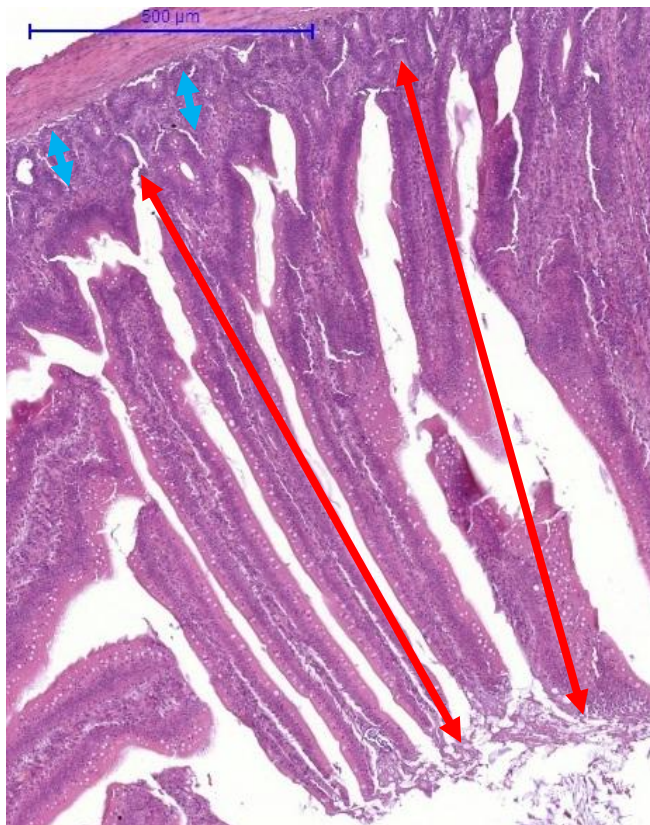
A jejunum mintákon végzett hisztometriai vizsgálataink alapján a bélbolyhok hossza a butiráttal kiegészített táppal takarmányozott csirkékben és patkányokban egyaránt kis mértékben, de nem szignifikánsan növekedett a kontroll csoporthoz képest ($p < 0,10$). Ehhez hasonló trend figyelhető meg a kripták mélységének alakulásában is, mindkét állatfajnál (5. táblázat). A **4. ábrán** egy butiráttal kiegészített takarmányt fogyasztó patkány, az **5. ábrán** egy kontroll patkány jejunum mintájának szövettani képe látható. A **6. és 7. ábra** ugyanezt mutatja be csirkében.



4. ábra. Butiráttal kiegészített táppal takarmányozott patkány jejunumának szövettani képe. (H.E.) Piros nyíllal jelölve a bélbolyh, kék nyíllal a kriptá. bar=100 μm

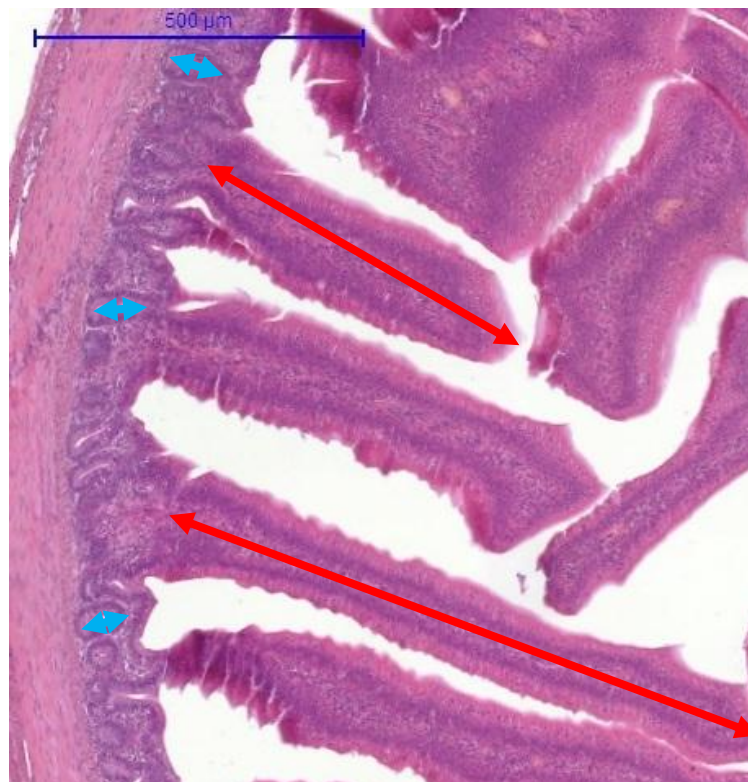


5. ábra. Kontroll táppal takarmányozott patkány jejunumának szövettani képe. (H.E.) Piros nyíllal jelölve a bélboholy, kék nyíllal a kriptá. bar=100 μ m



6. ábra: Butirátos táppal takarmányozott csirke jejunumának szövettani képe. (H. E.) Piros nyíllal jelölve a bélboholy, kék nyíllal a kriptá. bar=500 μ m

7. ábra: Kontroll táppal takarmányozott csirke jejunumának szövettani képe. (H.E.) Piros nyíllal jelölve a bélboholy, kék nyíllal a kriptá. bar=500 μ m



Az enterocyták mérete a butirátkiegészítést kapott csirkékben szignifikáns növekedést mutatott a kontroll állatokhoz képest, ugyanez a hatás patkányokban nem volt kimutatható. A szövettani vizsgálatok eredményeit az **5. táblázat** mutatja be.

5. táblázat. A butiráttal kiegészített táp hatása a jejunum proximalis részének szövettanára csirkében és patkányban (átlag $\pm$ szórás; *nem szignifikáns trend a kontroll csoporthoz viszonyítva, $p < 0,10$; **szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva, $p < 0,05$)

		Kontroll csoport	Butirárral kiegészített csoport
Bolyhok hossza (μm)	Csirke	1082,52 $\pm$ 193,37	1165,61 $\pm$ 228,11*
	Patkány	444,49 $\pm$ 79,68	537,77 $\pm$ 84,13*
Kripták mélysége (μm)	Csirke	147,17 $\pm$ 32,91	158,43 $\pm$ 34,60*
	Patkány	123,40 $\pm$ 33,35	159,93 $\pm$ 36,80*
Enterocyták magassága (μm)	Csirke	25,77 $\pm$ 2,16	30,33 $\pm$ 1,48**
	Patkány	18,60 $\pm$ 2,12	18,52 $\pm$ 2,25

A vérplazma vizsgálata

Szignifikáns különbség látható a csirke vérplazmák butirátkoncentrációjában, a butiráttal kiegészített táppal takarmányozott állatoknál ez az érték szignifikánsan ($p < 0,05$)

magasabb a kontroll csoporthoz képest. A plazma acetátkoncentrációja a butirátos csoportnál szintén növekedett a kontrollhoz képest, de a különbség nem volt szignifikáns ($p < 0,10$). Az eredményeket a **6. táblázat** mutatja be.

6. táblázat. Butirát- és acetátkoncentrációk csirke és patkány vérplazmában (átlag $\pm$ szórás;
* nem szignifikáns trend a kontroll csoporthoz viszonyítva, $p < 0,10$; ** szignifikáns különbség a kontroll csoporthoz viszonyítva, $p < 0,05$)

		Kontroll csoport	Butiráttal kiegészített csoport
Butirát ($\mu\text{mol/l}$)	Csirke	24,65 $\pm$ 19,65	53,75 $\pm$ 19,77**
	Patkány	25,00 $\pm$ 7,61	31,36 $\pm$ 4,88**
Acetát ($\mu\text{mol/l}$)	Csirke	1149,83 $\pm$ 191,16	1298,00 $\pm$ 250,16*
	Patkány	428,00 $\pm$ 102,5	423,16 $\pm$ 97,00

A vérplazma butirátkoncentrációja a takarmány butiráttal történő kiegészítése után patkányokban is szignifikánsan növekedett a kontroll csoportéhoz viszonyítva, de nem mutattunk ki szignifikáns különbséget a plazma acetáttartalmában.

A vérplazmából emellett meghatároztuk a glükóz-, illetve triglicerid-koncentrációt. Eredményeink alapján a takarmány butirátkiegészítése egyik vizsgált állatfaj esetében sem befolyásolta ezeket az értékeket. Az adatokat a **7. táblázat** mutatja be.

7. táblázat: Glükóz- és triglicerid-koncentrációk a csirke és patkány vérplazmában

		Kontroll csoport	Butiráttal kiegészített csoport
Glükóz (mmol/l)	Csirke	14,44 $\pm$ 0,82	14,57 $\pm$ 0,82
	Patkány	7,92 $\pm$ 0,99	8,39 $\pm$ 1,15
Triglicerid (mmol/l)	Csirke	0,47 $\pm$ 0,06	0,48 $\pm$ 0,07
	Patkány	1,33 $\pm$ 0,40	1,45 $\pm$ 0,49

Megbeszélés

Eredményeink azt mutatják, hogy a takarmánykiegészítőként adott butirát csirkében előnyösen befolyásolta a heti súlygyarapodást, a takarmányfelvételt és a relatív takarmányhasznosulást az állatok életének első hetében. Ennek megfelelően a kísérlet 7., 14. és 21. napján szignifikánsan nagyobb testsúlyt mértünk a butirátos táppal takarmányozott brojlerek esetében. Azaz a butirátos állatok lényegében az első hét végére elért súlykülönbséget tartották meg a teljes kísérlet során.

Ezzel szemben patkányban nem tapasztaltuk a butirát hasonló, előnyös hatásait, egyedül az első heti súlygyarapodás és FCR mutatott kis mértékű, pozitív változást a kontroll csoporthoz képest, de a különbség nem volt szignifikáns.

A két állatfaj közötti különbségek részben az állatok eltérő életkorával magyarázhatók. Le Gall et al. (2009) a takarmánykiegészítőként adott butirát hatását hasonlították össze választás előtti és választás utáni malacokon. Eredményeik szerint azok az állatok, amelyek a választás előtt, a tejjel is vettek fel butirátot, szignifikánsan nagyobb növekedési erélyt mutattak, mint azok, amelyek csak a választás után kapták a kiegészítést, bár az utóbbiak is szignifikánsan gyorsabban gyarapodtak a kontroll állatokhoz képest. Egy másik vizsgálat során újszülött malacokat tápláltak butiráttal kiegészített tejjel, és a testsúly szignifikáns növekedését mutatták ki a kontroll csoporthoz képest (Kotunia et al., 2004). Ez alapján feltételezhető tehát, hogy a butirát növekedésre gyakorolt hatása jelentős mértékben függ az állatok életkorától.

Brojlercsirkék esetében hasonló életkori függést mutattak ki a hozamfokozóként adott mannánoligoszacharidok esetében, amelyek a mannóz-kötő receptorokhoz kapcsolódva megakadályozzák, hogy az 1-es típusú fimbriával rendelkező baktériumok megtapadjanak a gastrointestinalis traktusban (Yang et al., 2005).

Mindezek alapján feltételezzük, hogy a választás utáni patkányokban elsősorban a bélflóra érettsége miatt nem tudta kifejteni előnyös hatásait a butirát. A csirkék viszont napos koruktól kezdve a kiegészített takarmányt kapták, a butirát tehát szelektív antimikrobiális és prebiotikus hatásának köszönhetően pozitívan hatott a kialakulóban levő bélflóra egyensúlyára, ezáltal az állatok növekedésére és takarmányhasznosítására. A hatás korfüggését támasztja alá az is, hogy patkányban a kísérlet első hetében egy nem szignifikáns

trend ($p < 0,10$) mutatható ki: a butirát kis mértékben fokozta a heti súlygyarapodást és csökkentette az FCR értékét.

A két vizsgált állatfaj közötti különbségek természetesen nem magyarázhatók kizárólag az életkor különbözőségével, hanem abban a madarak és emlősök eltérő táplálkozás-élettani sajátosságai is szerepet játszhatnak. Érdekes lenne a későbbiekben megvizsgálni a butirát növekedésre kifejtett hatásának korfüggését mindegyik fajban, csirkében azonban a napos kortól történő, míg emlősökben kizárólag a választás utáni adagolás bír gyakorlati jelentőséggel.

A vékonybél szövettani szerkezetére gyakorolt hatások tekintetében azonos trend figyelhető meg mindegyik vizsgált faj esetében: a butirát kis mértékben fokozta a bélbolyhok hosszát és a kripták mélységét a jejunumban, csirkében és patkányban egyaránt. Ezek az eredmények összhangban vannak a bélbolyhok esetében Hu és Guo (2007), illetve a kripták esetén Antongiovanni et al. (2007) eredményeivel.

Érdekes, hogy csirkében a butirát pozitív trofikus hatást gyakorolt az enterocyták méretére, míg ez a hatás patkányban hiányzott. A butirát direkt trofikus hatását már korábban is leírták, például kérődzők bendőhámjában (Gálfí et al., 1981). Csirkében tehát eredményeink alapján feltételezhetően elsősorban hipertrófiás, patkányban pedig hiperpláziás változások állnak a butirát bélhámra kifejtett hatásainak hátterében. Ez utóbbit támasztja alá Sakata (1987) is, aki hiperpláziát jelentő emelkedett CCPR-értéket mutatott ki butirát hatására patkánybélben. Ennek tisztázására azonban további vizsgálatok szükségesek, így terveink között szerepel az apoptotikus és proliferáló sejtek kimutatása immunhisztokémia segítségével.

A jejunum mucosájában bekövetkező morfológiai változások a felszívódás hatékonyságának növelésén keresztül segíthetik a takarmányhasznosítás javítását, így az antimikrobiális hatás mellett fontos tényezőt képeznek a butirát hatásmechanizmusában.

A plazmamintákból végzett mérések eredményéből kitűnik, hogy a butirát koncentrációja szignifikánsan megnőtt butirátetetés hatására mindkét állatfajban, a takarmánnyal – viszonylag alacsony, 1,5 g/takarmány-kg koncentrációban, valamint nem védett formában – a szervezetbe juttatott butirát olyan mennyiségben szívódik fel a bélből, és jut át a májon, hogy a szisztémás keringéssel a perifériás (extrahepatikus) szövetekhez is eljut, és ott képes kifejteni hatásait.

Munkacsoportunk korábbi *in vitro* vizsgálatai (Annus, 2010) alapján azt vártuk, hogy a májban a β -oxidációba lépő butirát jelentős mennyiségű acetát képződéséhez vezethet patkányban. Ezzel szemben egyik fajban sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a vérplazma acetátkoncentrációjában, csirkében azonban az a trend mérhető, hogy kis mértékben emeli a takarmánnyal adott butirát a plazma acetátkoncentrációját ($p < 0,10$). Ez azért különösen meglepő, mert az acetát képződéséért közvetlenül felelős tioészteráz, az acetil-KoA-hidroláz csirkében hiányzik (Crabtree et al., 1990). Patkányban a várt különbség elmaradása azzal magyarázható, hogy a butirát β -oxidációjában képződő acetil-KoA – mint az intermediér anyagcsere központi vegyülete – könnyen beléphet más anyagcsere-folyamatokba is, és ezért nem jut ki a szisztémás keringésbe.

Mivel a gázkromatográfiás mérések eredményei alapján látható, hogy a butirát eljut a perifériás szövetekhez, így feltételeztük, hogy itt a sejtek inzulinérzékenységének fokozása miatt megváltoztathatja a vérplazma glükóz- és triglicerid-koncentrációját. Várakozásainkkal szemben a 1,5 g/kg butiráttal történő takarmány-kiegészítés nem befolyásolta a vérplazma glükóz-, illetve triglicerid-koncentrációját egyik állatfajban sem. Ez valószínűleg a butirát alkalmazott alacsony dóziséval magyarázható, további kísérletek szükségesek annak vizsgálatára, hogy magasabb koncentrációban adott butirát befolyásolhatja-e a perifériás szövetek glükózfelvételét, illetve szénhidrát- és lipidanyagcseréjét.

Összefoglalás

Az illó zsírsavak közé tartozó butirátot – az állatok növekedési erélyére és a bélflóra gyakorolt előnyös hatásai miatt – széles körben alkalmazzák takarmánykiegészítőként, elsősorban a nagyüzemi baromfi- és sertéstartásban. Ez a hagyományos antimikrobiális hozamfokozók használatának betiltása miatt kiemelkedő jelentőséggel bír az Európai Unió országaiban.

Munkánk során célul tűztük ki a butirát, mint takarmánykiegészítő növekedési erélyre és a vékonybél nyálkahártya szövettani szerkezetére gyakorolt hatásainak összehasonlító vizsgálatát a célállatnak számító brojlersirkében, valamint patkányban, mint monogastriкус emlős modellállatban.

Hús, Bábolna Tetra naposcsibét vontunk be az etetési kísérletbe, ebből tíz állatot 1,5 g/takarmány-kg dózisban nátrium-butiráttal kiegészített starter brojlertáppal, tíz állatot pedig kontroll táppal takarmányoztunk. A patkány kísérlethez hús, öthetes Wistar patkányt használtunk fel, tíz állat takarmányát nátrium-butiráttal egészítettük ki (1,5 g/takarmány-kg), tíz patkány pedig kontroll rágcsálótápot kapott. Az állatok súlyát és takarmányfelvételét folyamatosan mértük az etetési periódus során. 21 nap után a kísérleti állatokat kiirtottuk, és szövettani vizsgálat céljára mintát vettünk a jejunumból, amelyen hematoxillin-eozin festést követően hisztometriai méréseket végeztünk: a bélbolyhok hosszát, a crypták mélységét és az enterocyták magasságát mértük.

Eredményeink azt mutatják, hogy a brojlersirkéknek takarmánykiegészítőként adott butirát szignifikánsan magasabb heti súlygyarapodást és takarmányfelvételt, illetve hatékonyabb relatív takarmányhasznosítást eredményezett a kontroll csoporthoz képest az állatok életének első hetében. Ezzel ellentétben a táp butirátkiegészítése nem befolyásolta a választás utáni patkányok növekedését, ami elsősorban az életkori sajátosságokkal, így a már érett bélflóra kialakulásával magyarázható. A butirát mindkét fajban kis mértékben fokozta a jejunum bélbolyhainak hosszát és a crypták mélységét, de a kontroll csoporthoz viszonyított különbség nem bizonyult szignifikánsnak. Csirkében a butirátos csoportban szignifikánsan nagyobb átlagos enterocyták magasságát mértünk, mint a kontroll állatoknál, a butirát tehát hipertrofikus hatásúnak bizonyult a vékonybél hámsejtjeire. Patkányban hasonló hatást nem tapasztaltunk. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a butirát vékonybél morfológiára gyakorolt hatása alapvetően befolyásolja az állatok növekedését és takarmányértékesülését.

Summary

The short chain fatty acid butyrate is widely used as a feed additive because of its positive effect on growth performance and on the gut microflora, first of all in poultry and pig nutrition. This is of special importance because of the banning of the traditional antimicrobial growth promoters in the EU.

The aim of our study was to compare the effects of alimentary supplied butyrate on growth performance and on micromorphology of small intestinal mucosa in broiler chicken and rat, the latter as a model animal for monogastric mammals.

Twenty one-day-old Bábolna Tetra broiler chickens were included in the chicken feeding experiment. Experimental animals were randomized into two groups: ten control chickens were fed by a control starter diet, and ten broilers by the same feedstuff supplemented with sodium butyrate with the concentration of 1.5 g/kg diet. Twenty five-weeks-old Wistar rats were included in the rat feeding experiment. They were classified into two groups: ten control animals were fed by commercially available pelleted diet for rodents, while ten rats with the same feed, supplemented with sodium butyrate with the concentration of 1.5 g/kg diet. Growth parameters and feed intake were measured regularly. Animals were exterminated after 21 days and tissue samples were taken from the jejunum in both species. Gut samples were examined after hematoxylin-eosin staining with histometrical measurement of height of villi, depth of crypts and height of enterocytes.

It was found that dietary supplementation of sodium butyrate had beneficial effects on body weight gain, feed intake and feed conversion ratio in broiler chickens in the first week of life. However, butyrate supplementation had no positive effects on growth of rats directly after weaning. The absence of the positive effect can be explained with the already matured gut flora at the time of the beginning of the experiment. Butyrate tended to increase height of villi and depth of crypts in both species, while butyrate had a significant positive hypertrophic effect on the enterocytes in chicken, but not in rat. On the basis of these results, we suggest that influence of butyrate on the growth parameters might be based partially on the morphological changes of the small intestinal mucosa.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a tudományos diákköri dolgozatom létrejöttéhez elengedhetetlen közreműködéséért, kitartó lelkesítéséért és fáradhatatlan segítségnyújtásáért témavezetőimnek, Dr. Mátis Gábornak és Dr. Kenéz Ákosnak. Dr. Neogrády Zsuzsanna tanárnőnek hálásan köszönöm a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét, állandó támogatását és munkánk folyamatos koordinálását.

A Gyógyszertani és Méregtani Tanszékről köszönetemet fejezem ki Prof. Dr. Gálfi Péter és Dr. Csikó György tanár uraknak, hogy folyamatos szakmai segítséget nyújtottak munkánkhoz.

Köszönöm Prof. Dr. Frenyó V. László tanszékvezető egyetemi tanár úrnak és Dr. Veresegyházy Tamás osztályvezető egyetemi docens úrnak a lehetőséget, hogy bekapcsolódhattam a tanszéki kutatómunkába. Dr. Fébel Hedvignek, a herceghalmi Állattenyésztési és Takarmányozási Kutatóintézet főigazgató-helyettesének a gázkromatográfiás mérések elvégzéséért, Dr. Jakab Csabának, Dr. Palade Elena Alinának és Gombár Gabriellának a szövettani vizsgálatok során nyújtott segítségéért jár köszönet.

Köszönöm az Élettani és Biokémiai Tanszék valamennyi munkatársának a közreműködését, külön köszönettel tartozom Kulcsár Annának a statisztikai elemzések elkészítésében, Benedek Tündének és Annus Katának pedig a mintavételezések során nyújtott nélkülözhetetlen segítségéért.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni családomnak és barátaimnak türelmüket és támogatásukat, hiszen enélkül a dolgozat nem jöhetett volna létre.

Irodalomjegyzék

- ANNUS, K. (2010): *A nátrium-n-butirát felvételének és metabolizmusának vizsgálata patkány primer májsejttenyészetén.* TDK dolgozat. SzIE ÁOTK, Budapest
- ANTONGIOVANNI, M., BUCCIONI, A., PETACCHI, F., LEESON, S., MINIERI, S., MARTINI, A. AND CECCHI, R. (2007): *Butyric acid glycerides in the diet of broiler chickens: effects on gut histology and carcass composition.* Ital. J. Anim. Sci., 6, 19-25.
- BERGMAN, F. N. (1990): *Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species.* Physiol. Rev., 70, 567-590.
- BORDIN, M., D'ATRI, F., GUILLEMOT, L. AND CITI, S. (2004): *Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins.* Mol. Canc. Res., 2, 692-701.
- CHO, H. J., KIM, S. Y., KIM, K. W., KANG, W. K., KIM, J. I., OH, S. T., KIM, J. S. AND AN, C. H. (2009): *The combination effect of sodium butyrate and 5-Aza-2'-deoxycytidine on radiosensitivity in RKO colorectal cancer and MCF-7 breast cancer cell lines.* World J. of Surg. Onc., 7:49
- CRABTREE, B., GORDON, M. J., CHRISTIE S. L. (1990): *Measurement of the rates of acetyl-CoA hydrolysis and synthesis from acetate in rat hepatocytes and the role of these fluxes in substrate cycling.* Biochem. J., 270., 219-225.
- CSORDÁS, A. (1996). *Butyrate, aspirin and colorectal cancer.* European Journal of Cancer Prevention, 5, 221–231.
- DAVIDSON, P. M. (2001). Chap. 29. *Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds.* Pages 593–627 in Food Microbiology—Fundamentals and Frontiers. 2nd ed. M. P. Doyle, L. R. Beuchat, and T. J. Montville, ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- FERNÁNDEZ-RUBIO, C., ORDÓÑEZ, C., ABAD- GONZÁLEZ, J., GARCIA- GALLEGRO, A., PILAR HONRUBIA, M., JOSE MALLO, J., BALANA-FOUCE, R. (2008): *Butyric acid based feed additives help protect broiler chickens from Salmonella enteridis infection.* Poultry Sci., 88, 943-948.

- FRIEDMAN, A., BAR-SHIRA, E. (2005): *Effect of nutrition on development of immune competence in chickens gut associated lymphoid system*. pp. 234-242 in Proc. 15th Eur. Symp. on Poultry Nutrition. WPSA, Balatonfüred, Hungary.
- GÄBEL, G., MARTENS, H., SUENDERMAN, M., & GÁLFI, P. (1987). *The effect of feeding either roughage or concentrate diets on sodium, chloride and magnesium absorption from the temporarily isolated and washed reticulo-rumen of sheep*. Quarterly Journal of Experimental Physiology, 72, 146–150.
- GÁLFI, P., NEOGRÁDY, S. AND KUTAS, F. (1981): *Culture of epithelial cells from bovine ruminal mucosa*. Veterinary Research Communication, 4, 295–300.
- GÁLFI, P., BOKORI, J. (1990): *Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate*. Acta Vet. Hung., 38, 3–17.
- GÁLFI, P., NEOGRÁDY, S. (2001): *The pH-dependent inhibitory action of n-butyrate on gastrointestinal epithelial cell division*. Food Research International, 34, 581-586.
- GANTOIS, I., DUCATELLE, R., PASMANS, F., HAUTEFORT, I., THOMPSON, A., HINTON, J. C. AND VAN IMMERSEEL, F. (2006): *Butyrate specifically down-regulates Salmonella pathogenicity island 1 gene expression*. Applied and Environmental Microbiology, 72, 946-949.
- GAO, Z. J., YIN, J., ZHANG, R. E. WARD, R. J. MARTIN, M. LEFEVRE, W. T. CEFALU, AND J. YE (2009): *Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice*. Diabetes, 58, 1509-1517.
- GUILLOTEAU, P., MARTIN, L., ECKHAUT, V., DUCATELLE, R., ZABIELSKI, R. AND VAN IMMERSEEL, F. (2010): *From gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate*. Nutrition Research Reviews, 23, 366-384.
- HU, Z. AND GUO, Y. (2007): *Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens*. Animal Feed Science and Technology, 132, 240-249.
- KAUFMAN, W., HAGEMMEISTER, H. & DIRKSEN, H. (1979). *Adaptation to changes in dietary composition, level and frequency of feeding*. In Y. Ruckebush, & P. Thivend

- (Eds.), Digestive physiology and metabolism in ruminants, Proc. of the 5th International Symposium on Ruminant Physiology (pp. 587–602). Clermont-Ferrand.
- KNUDSEN, K. E. B., SERENA, A., KJAER, A. K. B., JORGENSEN, H AND ENGBERG, R. (2005): *Rye bread enhances the production and plasma concentration of butyrate but not the plasma concentrations of glucose and insulin in pigs*. J. Nutr., 135, 1696-1704.
- KOTUNIA, A., WOLIŃSKI, J., LAUBITZ, D., JURKOWSKA, M., ROMÉ, V., GUILLOTEAU, P. AND ZABIELSKI, R. (2004): *Effect of sodium butyrate on the small intestine development in neonatal piglets feed by artificial sow*. J Physiol Pharmacol.
- LEESON, S., NAMKUNG, H., ANTONGIOVANNI, M. AND LEE, E. H. (2005): *Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens*. Poult Sci. 84 (9), 1418-1422.
- LE GALL, M., GALLOIS, M., SÈVE, B., LOUVEAU, I., HOLST, J. J., OSWALD, I. P., LALLÈS, J. P. AND GUILLOTEAU, P. (2009): *Comparative effect of orally administered sodium butyrate before or after weaning on growth and several indices of gastrointestinal biology of piglets*. Br J Nutr., 102, 1285-1296.
- MAHDAVI, R. AND TORKI, M. (2009): *Study on usage period of dietary protected butyric acid on performance, carcass characteristics, serum metabolite levels and humoral immune response of broiler chickens*. Journal of Animal and Veterinary Advances, 8 (9), 1702-1709.
- MYZAK, M. C., DASHWOOD, W. M., ORNER, G. A., HO, E. AND DASHWOOD, R. H. (2006): *Sulforaphane inhibits histone deacetylase in vivo and suppresses tumorigenesis in Apc-minus mice*. Faseb J., 20, 506-508.
- PHILLIPS, I. (2007): *Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health*. Antimicrobial Agents, 30, 101-107.
- RUSSELL, J. B. (1992):. *Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling*. J. Appl. Bacteriol. 73:363–370
- SAKATA, T. (1987): *Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of*

fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors, British Journal of Nutrition, 58, 95-103.

SEGAIN JP, RAINGEARD DE LA BLÉTIÈRE D, BOURREILLE A, LERAY V, GERVOIS N, ROSALES C, FERRIER L, BONNET C, BLOTTIÈRE HM, GALMICHE JP. (2000): *Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease*. Gut. 2000 Sep;47(3):397-403.

VAN IMMERSEEL, F., BOYEN, I., GANTOIS, L., TIMBERMONT, L., BOHEZ, L., PASMANS, F., HAESBROUCK F., AND DUCATELLE, R. (2005): *Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of Salmonella in poultry*. Poultry Science. 84, 1851– 1856.

VELÁZQUEZ, O. C., LEDERER, H. M., ROMBEAU, J. L (1997):. *Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications*. Adv Exp Med Biol., 427, 123-134.

YANG, Y., CHOCT, M. AND IJI, P. A. (2005): *Effect of dietary mannanoligosaccharide level on performance and gross morphology of digestive tract segments of broiler*. Pages 72–75 in Proc. 17th Annu. Aust. Poult. Sci. Symp., Sydney, NSW, Australia. Poult. Res. Found., Univ. Sydney, Australia

YOO, E. J., CHUNG, J. J., CHOE, S. S., KIM, K. H. AND KIM, J. B. (2006): *Down-regulation of histone deacetylases stimulates adipocyte differentiation*. J Biol Chem, 281, 6608-6615.

ZHANG, W. H., JIANG, Y., ZHU, Q. F., GAO, F., DAI, S. F., CHEN, J. AND ZHOU, G. H. (2011): *Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens*. British Poultry Science, 52 (3), 292-301.