

**Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar
Élettani és Biokémiai Tanszék**

**A butirát enterális citokróm P450 méregtelenítő
enzimekre gyakorolt hatásának vizsgálata
csirkében**

Készítette: Karsai Szófia Ludmilla

Témavezető: Kulcsár Anna

Budapest

2014.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	2
Bevezetés és irodalmi áttekintés.....	3
Az illózsírsavak fogalma, élettani hatásai	3
A butirát hatásai.....	4
A butirát epigenetikus hatása.....	5
A citokróm P450 enzim szuperfamilia tulajdonságai, lokalizációja különös tekintettel a bélrendszerre.....	7
A butirát kiegészítés szerepe a brojlercsirke takarmányozásában.....	10
Célkitűzés	12
Anyag és módszer.....	13
A kísérleti állatok tartástechnológiája és annak szabályai.....	13
A mintavételezés folyamata	17
Az illózsírsav-koncentráció mérése gázkromatográfiás módszerrel	18
A bélmikroszoma izolálás módja	18
A CYP450 enzimaktivitás mérésének módszere.....	20
<i>Mikroszómális összfehérje-koncentráció meghatározás BCA módszerrel.....</i>	20
<i>Aminopirin-N-demetilációs próba (Nash protokoll szerint).....</i>	20
Statisztikai módszerek	22
Eredmények.....	23
Termelési paraméterek	23
A butirát tartalmú takarmánykiegészítők és a takarmány NSP tartalmának hatása a vékony- és a vastagbél tartalma butirát koncentrációjára.....	24
Átlagos enzimaktivitás mérés aminopirin-N-demetilációs módszerrel.....	27
Megbeszélés.....	29
Összefoglalás	33
Summary.....	34
Köszönetnyilvánítás	36
Irodalomjegyzék	37

Rövidítések jegyzéke

AME_n = nulla nitrogénretencióra korrigált látszólagos metabolizálható energia

ATP = adenozin-trifoszfát

CAR = konstitutív androsztán receptor

CYP = citokróm P450 enzimcsalád

DNS = dezoxiribonukleinsav

EDTA = etilén-diamin-tetraecetsav

ÉEVI = élelmezés egészségügyi várakozási idő

FAD = flavin-adenin-dinukleotid

FCR = relatív takarmányhasznosulás, feed conversion rate

FMN = flavin-mononukleotid

g (centrifuga) = a gravitációs gyorsulás jele (9,81 m/s²)

GALT = bélhez kapcsolódó limfoid szövet, gut associated lymphoid tissue

H = hiszton

HAT = hiszton-acetiltranszferáz

HDAC = hiszton-deacetiláz

MCT1 = monokarboxilát-transzporter-1

n = egyedszám / mintaelemszám

NADPH+H⁺ = nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát redukált formája

NSP = nem keményítő poliszacharid, non-starch polysaccharide

p = tévedési valószínűség

PBS = foszfát pufferolt fiziológiás sóoldat, phosphate buffered saline

pH = az oxóniumionok koncentrációjának negatív tízes alapú logaritmus a vizes oldatban

TCA = triklór-ecetsav

V_{max} = maximális reakciósebesség

μl = mikroliter

Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az illózsírsavak fogalma, élettani hatásai

Az állati szervezet szénhidrátforgalmába bekapcsolódni képes rövid szénláncú, monokarbonsavakat nevezzük illózsírsavaknak. Ide tartozik a két szénatomos ecetsav (acetát), a három szénatomos propionsav, a négy szénatomos vajsav (butirát), az öt szénatomos valeriansav (valeriát) és a hat szénatomos kapronsav. Számottevő mennyiségben termelődik acetát, propionát és butirát az állati szervezetben a strukturális poliszacharidok anaerob mikrobiális fermentációja során (Bergman, 1990).

A kérődző állatokra jellemző, hogy az előgyomraikban nagymértékű mikrobiális tevékenység zajlik. Monogasztrikus emlősállatokban a colonban, madarakban a caecumban folynak ugyanezek a bakteriális folyamatok. Rostban és nem keményítő típusú poliszacharidban (továbbiakban: NSP) gazdag takarmányozás esetén a legjelentősebb az illózsírsavak képződése. Ennek oka az, hogy a rostot az emlősállatok emésztőenzimeik nem képesek lebontani, de a colonban és a caecumban élő baktériumok által termelt extracelluláris enzimek számára megfelelő szubsztrátoknak bizonyulnak. A bélcsatornában az illózsírsavak százalékos megoszlása egymáshoz viszonyítva: acetát: propionát: butirát = 75 : 15 : 10. A takarmány összetétele megváltoztathatja az illózsírsavak egymáshoz viszonyított arányát és összes mennyiségét, ezáltal a béltartalom illózsírsav-koncentrációját is befolyásolhatja. Az NSP-ből keletkező illózsírsav-koncentráció a colonban 80-120 mmol/l között változik növényevő emlős fajokban (Bergman, 1990; Kristensen *et al.*, 1995).

Az illózsírsavak felszívódása a gyomor-bélrendszerből aktív és passzív módon történhet. Mivel vizsgálataim során a négy szénatomos n-butirát (továbbiakban: butirát) keletkezését és hatását tanulmányoztam, ennek az illózsírsavnak a transzportját részletezem. A passzív transzport során a vajsav nem disszociált formában – lipofil tulajdonságnak köszönhetően – könnyen penetrál a citoplazmamembránon át a sejtekbe. A sejtben a vajsav disszociál, így a butirát passzív transzporttal már nem tud a sejtből kijutni, ezért az intracelluláris koncentrációja nagymértékben megemelkedik. Az aktív formát egy fehérje-mediált folyamat jelenti, amikor a monokarboxilát-transzporter-1 (MCT1) H^+ /butirát szinporttal juttatja a butirátot a sejtek belsejébe (Annus, 2010).

A többüregű gyomorral rendelkező állatokban a vércukor nagyrészt a propionát glükogenetikus átalakításával képződik, ezzel biztosítva az állandó, kérődzőkre jellemző, viszonylagos alacsony vércukorszintet (2-3mmol/l). Az acetát és a butirát a ketogenetikus illózsírsavak közé tartozik, energiahiány esetén ezekből a májban ketonanyagok keletkeznek, melyek a perifériára kerülve energiát biztosítanak az extrahepatikus szöveteknek. Az illózsírsavak közül a butirát az, melynek élettani, takarmányozástani és gazdasági szempontból a legnagyobb jelentősége van.

A butirát hatásai

A butirát a lineáris, négy szénatomból álló vajsav anionja. A β -oxidáció egyik kiindulási vegyülete, így energiát biztosít az állati szervezet részére. A gastrointestinalis traktusban a colonocyták számára elsődleges energiaforrást jelent (Velázquez *et al.*, 1997). Mindezek mellett meghatározó biológiai aktivitással, így például epigenetikus és receptormediált hatással is rendelkezik.

A butirátot elterjedten használják alternatív hozamfokozó szerként, mert pozitív hatása van az állatok súlygyarapodására és javítja a takarmányértékesítést (Gálfi és Bokori, 1990).

Hozzájárul a GALT (gut associated lymphoid tissue) kialakulásához fiatal állatokban (Friedman *et al.*, 2005), azáltal hogy fokozza a sejtek összekapcsolásáért felelős úgynevezett tight junction fehérjék (okkludin, cingulin) expresszióját, így a bél barrier funkciója javul, s ez gyorsabban kialakuló és jobban működő immunrendszert biztosít a fiatal állatok számára (Bordin *et al.*, 2004).

Korábban leírták a butirát apoptózist okozó hatását, ezért humán daganatos sejteken több kutatást végeztek, mely kedvező eredményt adott a butirát daganatellenes hatásait igazolva (Medina, 1997; Leu, 2007). Ezen előnyös tulajdonságának leírását követően a butirát humángyógyászati jelentősége is lényegessé vált. A legfőbb kutatási területet a butirát colorectalis daganatokra gyakorolt hatása jelenti.

A butirát csirkében a vékonybél nyálkahártyáján morfológiai változásokat okoz, elősegíti a bélhámsejtek regenerációját és proliferációját (Roediger, 1982). Mélyebbek lesznek a Lieberkühn-kripták (Antongiovanni *et al.*, 2007), hosszabbá válnak a villusok és mérhető hipertrófia következik be a jejunum enterocytáiban (Nyáry, 2013). Ezen hisztometriai változások együttesen megnövekedett felszívó felületet biztosítanak, így javul a takarmányértékesítés (Hu and Guo, 2007).

A butirát egyik leglényegesebb tulajdonságát az antimikrobiális hatása jelenti. Ez a hatás azzal magyarázható, hogy a baktériumokba a butirát nem disszociált vajsav formában, lipofil tulajdonságának köszönhetően passzív transzporttal jut be, majd az extracellulárishoz képest magasabb intracelluláris pH-jú környezetben disszociál (Warnecke and Gill, 2005). Következésképpen megnövekszik a sejtbeli disszociált forma koncentrációja, ami így már a sejtből nem tud a koncentráció különbségnek megfelelően kiáramlani. Ez az intracelluláris pH szint csökkenéséhez vezet (Russel, 1992), amely hatására a baktériumban működni kezd a protonpumpa, mely aktív transzporttal juttatja ki a sejtől a H^+ ionokat. Ebből adódóan a sejt energiatartalékai felhasználódnak, a baktérium elpusztul. Az antimikrobiális hatás a vastagbélben lokalizálódó baktériumflóra egyensúlyának fenntartásában fejeződik ki. Brojlercsirkében *Salmonella enterica* serovar. Enteritidis (továbbiakban: *S. Enteritidis*), *Escherichia coli* (továbbiakban: *E. coli*) és egyes *Clostridium* fajok ellen szelektív hatékonyságúnak bizonyult. Csökkenti a fertőződés utáni baktériumszaporodást, a bélsárral való ürülést és a környezet *S. Enteritidis* terhelését (Van Immerseel *et al.*, 2005; Fernández- Rubio *et al.*, 2008). *Campylobacter jejuni* elleni antibakteriális hatását *in vitro* kísérletekben igazolták (Kulcsár *et al.*, 2013).

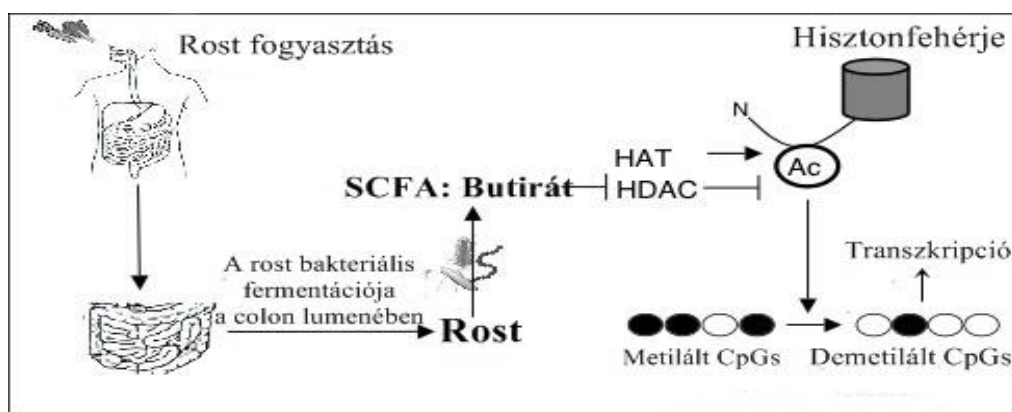
A butirát coccidiumellenes hatását is leírták vakcinázott (Leeson *et al.*, 2005) és nem vakcinázott (Antongiovanni *et al.*, 2007) állatokon. Csirkéket *Eimeria* oocystákkal kísérletileg fertőztek, majd butirát kiegészítést tartalmazó táp hatására, mindkét csoportban testtömeg növekedést tapasztaltak.

A butirát epigenetikus hatása

A butirát biológiai hatásai részben az epigenetikus tulajdonságán alapulnak. Az epigenetikus hatás jelentése az, hogy habár a DNS szekvenciában nem történik változás, így a genomban sem, de megváltozik az adott fehérje génről történő transzkripció mértéke és az adott gén transzkripciós mintázata. Ez azt jelenti, hogy az epigenetikus hatású vegyületek, mint a butirát, regulációs tulajdonsággal rendelkeznek, vagyis szabályozzák az adott fehérjék termelődésének sebességét és milyenségét.

A butirát az epigenetikus hatását elsősorban a hisztonok modulációja során fejt ki. A hisztonok bázikus oldalláncú aminosavakban gazdag fehérjék. Öt típusát különböztetjük meg: H2A, H2B, H3, H4 és H1. A H2A és H2B hisztonok felépítésében a lizinnek van fontos szerepe, míg a H3-as és H4-es fehérjékben az arginin a kiemelkedő jelentőségű aminosav. A hisztonfehérjék a DNS-re jellemző szuperspiralizált szerkezetért és az ezt felépítő

nukleszómák kialakításáért felelősek. A DNS többszörösen feltekeredett strukturájának az osztódásban és a génexpresszió szabályozásában egyaránt központi szerepe van. A hisztonok a DNS-t stabilizálni képesek, ezt a láncvégi ϵ -aminocsoport és a guanidino-csoport biztosítja (Ádám *et al.*, 2001). Hatásmechanizmusának alapja az, hogy a lizin láncvégi ϵ -aminocsoportjának egy, illetve az arginin guanidino-csoportjának több nitrogénje protonálódhat, így a pH-tól függően jellemzően pozitív töltésűek lesznek. A DNS-t felépítő cukor-foszfátgerincben a foszfát a pH-tól függően általában negatív töltésű, így az ellentétes töltések révén tudja a hisztonfehérje stabilizálni a DNS láncot, ennek köszönhetően alakul ki a szuperspiralizált, jellegzetes szerkezet. A hiszton-acetiltranszferáz (továbbiakban: HAT) hatására acetilálódznak a hisztonfehérjék láncvégi amino-csoportjai, ezért a hiszton semleges töltésű lesz, így megszűnik a töltéskülönbségből adódó elsődleges összetartó erő. Ez a DNS stabil szerkezetének a megbomlását eredményezi, amely módosítja a génexpressziót és a molekula transzkripciós mintázatát. A HAT-tal antagonistá hatású enzim a hiszton-deacetiláz (továbbiakban: HDAC). A hisztonok acetiláltsági egyensúlyát a két enzim együttes működése tartja fent. A butirát az epigenetikus hatását a HDAC gátlásával feje ki, ezért felborul a hisztonok acetiláltsági egyensúlya, és az a hiperacetilált forma irányába tolódik el, ezáltal fokozva a transzkripciót (1. ábra). A butirát HDAC gátló hatása *in vitro* bizonyított (Candido *et al.*, 1978). Az *in vivo* csirkén végzett kutatásokat a Szent István Egyetem Állatorvostudományi Karán (SZIE-ÁOTK) az Élettani és Biokémiai Tanszéken végezték, ennek eredményei során kiderült, hogy a butirát bolusban adva a májban a H3 és H4-es hisztonokra dóziszfüggő módon, a H2A-ra mindegyik alkalmazott dózisban hat.



1. ábra: A rövid szénláncú illózsírsavak hatása a transzkripcióra.

SCFA: rövid szénláncú illózsírsav, short-chain fatty acid; **Ac:** acetil-csoport

HAT: hiszton-acetiltranszferáz ; **HDAC:** hiszton-deacetiláz

CpGs: citozin-foszfát-guanin régió, cytosine-phosphate-guanine site

(forrás: <http://www.med.unc.edu/genetics/faculty/bultman>)

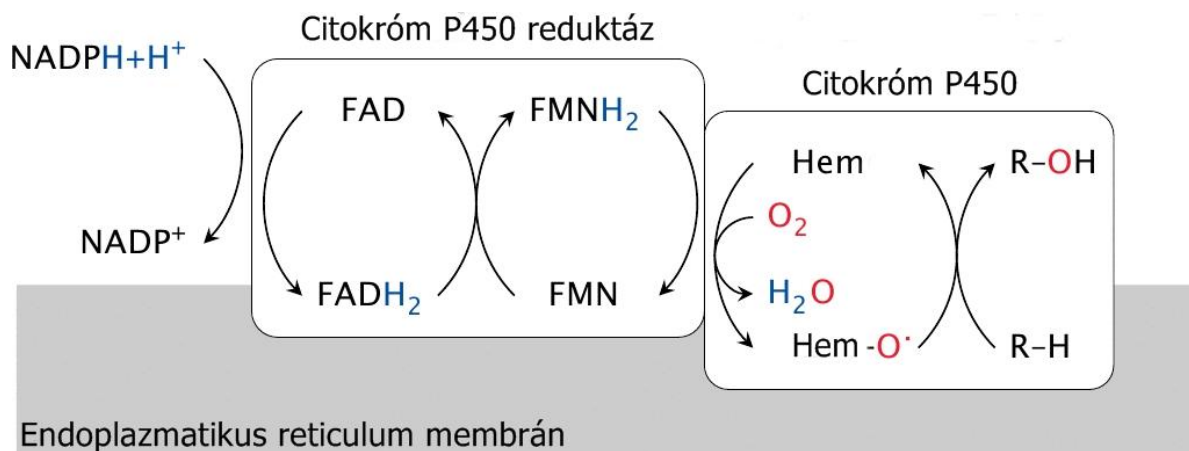
A citokróm P450 enzim szupercsalád tulajdonságai, lokalizációja különös tekintettel a bélrendszerre

A citokróm P450 (továbbiakban: CYP450) szupercsalád a hemoproteidek közé tartozó, monooxygenáz tulajdonsággal rendelkező izoenzimek csoportja. A hemoproteidek közé soroljuk, mert egy központi vas-(II) ion adja működésének alapját. A CYP450 igen sokrétű funkcióval rendelkezik mind az állati, mind az emberi szervezetben. Létfontosságú szerepe van a szteroid hormonok szintézisében, metabolizmusában, illetve az epesavak előállításában. A méregtelenítésben betöltött szerepe adja kiemelt gyakorlati jelentőségét. A detoxikáció célszerve a máj, ebből következik az, hogy ebben a szervben a legnagyobb az izoenzimek mennyisége és diverzitása. Aktivitásukra jellemző, hogy igen alacsony szubsztrát-koncentráció mellett működnek (10^{-15} - 10^{-6} mol/dm³), ami az intermediér anyagcsere enzimjeire nem igaz (Ádám *et al.*, 2001). Ez az érzékenység azért indokolt, mert a szervezetből eltávolítandó xenobiotikumok koncentrációja is hasonlóan alacsony. A CYP450 lokalizációját tekintve a májon kívül jelen van még a béltraktusban és a szteroid metabolizmusban fontos szerepet játszó szervekben, mint a here, a petefészek vagy a mellékvese.

A CYP450 csoportjába sok fajta enzim tartozik, ezért szükséges a rendszerezésük. Az enzimek jelölésének szabálya az, hogy az adott gén családot számmal, az alcsaládot betűvel és az egyes izoenzimeket az alcsaládon belül ismét számmal jelzik (például: CYP3A4) (Ádám *et al.*, 2001).

A detoxikációnak két fázisa van: az első fázis, mely során az apoláris molekulákat az egyes enzimek előkészítik a konjugációra azáltal, hogy arra alkalmas funkciós csoportokat alakítanak ki. Ezt követi a második fázis, amikor konjugálódnak a korábban átalakított molekulák és kiürülnek a szervezetből a vizelettel vagy a bélsárral. A CYP450 feladata az első fázisú reakcióban a konjugációra alkalmas funkciós csoportok kialakítása aromás hidroxiláció, N-dezalkilálás vagy oxidatív dezaminálás során (Ádám *et al.*, 2001). A detoxikációt katalizáló, kevert funkciójú monooxygenázok számára a NADPH+H⁺ biztosít elektronokat. A NADPH-citokrómP450-reduktáz oxidálja a NADPH+H⁺-t, így az elektronok a riboflavin tartalmú FAD és FMN működésén keresztül jutnak el a hem részhez, ahol annak vas-(III) ionját redukálják vas-(II) formává, így a hem képessé válik az O₂ megkötésre.

Az O_2 molekula egy további elektron megkötésével O^{2-} anionná alakul, így a megkötött szubsztrátra kerül egy oxigénatom, a másik pedig víz formájában távozik a rendszerből (2. ábra).



2. ábra: A CYP450 enzimcsalád működése.

NADPH+H⁺: nikotinamid-adenin-dinukleotid-hidrogénfoszfát; **NADP⁺**: nikotinamid-adenin-dinukleotid-foszfát

FAD: flavin-adenin-dinukleotid; **FADH₂**: FAD redukált formája

FMN: flavin-mononukleotid; **FMNH₂**: FMN redukált formája

(forrás: <http://watcut.uwaterloo.ca/webnotes/Metabolism/drugsCypActionMode.html>)

Az enzimtermelődést befolyásolják a takarmánnyal elfogyasztott vegyületek. A CYP450 enzimek legfőbb induktorai a következő növények: a káposzta, a fokhagyma és a zeller (Ádám *et al.*, 2001). Azonban számos gyógyszer is hasonló hatást vált ki. A nyugtató hatású és epilepsziaellenes barbiturátok hasonlóképpen indukálják az enzimeket, közülük a legmarkánsabb hatású a phenobarbital. Egyes vegyületek pontosan ellentétesen hatnak, és meggátolják az enzimek termelődését. Ilyen például az immunszuppresszív szerként alkalmazott cyclosporin-A, továbbá a dermális mycosisok kezelésére szisztémásan alkalmazott ketoconazol (Kageyama *et al.*, 2005).

A korábban leírt epigenetikus hatású butírárt többek közt a CYP450 enzimekre hat, amiknek fontos szerep jut a mérgeanyagok átalakításában. Az epigenetikus hatáson kívül a butírárt receptormediált úton is hathat a CYP450 termelődésre. Az epigenetikus út és a receptormediált út működése szorosan összekapcsolódik. A receptormediált hatást különböző típusú magreceptorok révén fejtheti ki a butírárt. A magreceptorok mindegyike intracelluláris jelátviteli utat indít el, melyeknek következtében fokozódhat vagy csökkenhet a CYP450 termelődése. A hatásmechanizmus alapja az, hogy a sejtfelületi receptorhoz egy megfelelő ligand (például: butírárt) kapcsolódik, ezáltal indul el a jelátvitel. Ezt követően aktiválódik a

konstitutív androsztán receptor (továbbiakban: CAR), ami megköt egy koaktivátor molekulát, és az így kialakult heterodimer kapcsolódik egy transzkripció faktorral (retinsav-X-receptor). Ez a komplex aktiválja a CYP gén megfelelő aktivátor modulját, és ez eredményezi a transzkripció intenzitás megváltozását.

Több kutatásra is sor került, melyek azt vizsgálták, hogy a butirát rendszeres alkalmazásának és az emellett alkalmazott gyógyszeres kezeléseknek van-e élelmiszerbiztonsági jelentősége. Ez azért fontos, mert a butirát CYP450 enzimekre gyakorolt feltételezett hatása következtében egyes gyógyszerek farmakokinetikai tulajdonságait befolyásolhatja, ezért az állatok gyógyszeres kezelése során bizonyos esetekben feltehetően újabb élelmezés egészségügyi várakozási időt (továbbiakban: ÉEVI) kellene megállapítani.

A SZIE ÁOTK-n az Élettani és Biokémiai Tanszék és a Gyógyszertani és Méregtani Tanszék közös kutatásai során kiderült, hogy a butirát csirke primer májsejten *in vitro* szignifikánsan hat a májban lévő CYP1A, CYP2H és a CYP3A enzimek génexpressziójára (Csikó *et al.*, 2014). Az *in vivo* vizsgálatok azonban azt igazolták, hogy habár mRNS szinten hatott a CYP1A és CYP2H enzimekre, de nem eredményezte az enzimaktivitás változását sem takarmánykiegészítőként (Mátis *et al.*, 2013a), sem bolusban adva (Mátis *et al.*, 2013b). Patkányon elvégzett *in vivo* vizsgálatok alátámasztották, hogy a butirát nem gyakorol hatást a májbeli CYP2B és CYP3A enzimek aktivitására (Mátis, 2013).

A gyógyszerek metabolizmusát tekintve fontos szerep jut a CYP450 enzimeknek a first-pass mechanizmus során, amikor a szájon át adott hatóanyagok a bélből felszívódva a portális keringéssel a májba kerülnek, és ott a detoxikációs folyamatoknak köszönhetően csökken a hatékony koncentráció. A first-pass mechanizmus jelentőségteljes szerve a máj, azonban a folyamat már a vékonybélben elkezdődik. Emberben a CYP3A4 és CYP2C (Zhang *et al.*, 1999), brojlercsirkében a CYP3A (Osselare *et al.*, 2013) enzimek aktivitását igazolták a vékonybél teljes hosszán. A CYP450 aktivitás a duodenumtól az ileum felé csökkenő tendenciát mutat (Obach, *et al.*, 2001). Arra való tekintettel, hogy ugyanazok az enzimek megtalálhatók úgy a vékonybélben, mint a májban, meg kell említeni, hogy a CYP450-ek mennyisége jóval csekélyebb a bélben. Az enzimaktivitások mérése során a maximális reakciósebességet (v_{max}) vizsgálva is eltéréseket találtak, amit a bélben lokalizálódó enzimek alacsonyabb koncentrációjával magyaráznak.

A butirát kiegészítés szerepe a brojlersirke takarmányozásában

A brojlersirke hizlalása 35-40 napig tart, ekkorra általában az állatok elérik a 2 kg feletti testsúlyt. Ezt intenzív 3 fázisos takarmányozással biztosítják. A 3 fázis azt jelenti, hogy három különböző összetételű tápot kapnak a nevelés ideje alatt. A kelés utáni napokban indítótápot, majd nevelőtápot és a 25. napot követően fokozatos áttéréssel befejezőtápot etetnek az állatokkal. A különböző beltartalmú tápokra azért van szükség, mert az állatok növekedési intenzitása az életkorral változik, és amíg az élet kezdetén a fehérjeépítés a számottevő, addig a befejezőtáp etetése idején már a lipogenezis a jellemző (Fekete *et al.*, 2004).

A brojlersirkét *ad libitum* etetik, mert „energiára eszik”, ami azt jelenti, hogy meghatározott energia tartalmú takarmányt fogyaszt el. A takarmányfelvétel nő, ha energiában szegényebb, és csökken, ha dúsabb a takarmány. Ezért fontos, hogy az energiatartalomhoz igazítsuk a további beltartalmi értékeket, így semmilyen táplálóanyagból nem lesz hiány a szervezetben, ezzel biztosítjuk a megfelelő erélyű növekedést (Fekete *et al.*, 2004).

A brojlersirke takarmányát nagy részben gabonamagvak teszik ki. Legelterjedtebben kukoricára és takarmánybúzára alapozzák a tápokat. A kukorica metabolizmusát tekintve gyorsan lebomló szénhidrátforrást jelent, a keletkezett monoszacharidok gyorsan felszívódnak a bélszakasz proximális részéről, így a colonban nem termelődik belőle jelentős mennyiségű illózsírsav. Azonban a takarmánybúzára alapozott takarmány kiegészítve rostbontásra alkalmas enzimekkel, inkább az illózsírsav termelődésnek kedvez, és a szervezet ebből nyer később energiát. A gabonamagvak közül brojlersirke takarmányozásához korlátozott mennyiségben, de használnak még zabot, árpát és tritikálét. A takarmányok fehérjetartalmát az olajos magvak adják, mint a napraforgó, a repce és a csillagfürt magvai (Fekete *et al.*, 2004).

Az intenzív, XXI. századi baromfitakarmányozási technológiából sosem maradhatnak ki a megfelelő alternatív takarmánykiegészítések. A nagyüzemi baromfitartásban elterjedten használják a butirát alapú termékeket, ilyen a nátrium-butirát, a kalcium-butirát vagy a védett formájú butirát. Több lehetőség van a butirát védetté tételére, ilyen eljárás az észterezés rövid szénláncú alkoholokkal (gyümölcsészter készítése), a gliceridek előállítása, illetve a mikrokapszulázás (Butipearl).

A „Butipearl” mikrokapszulázott kalcium-butirátot tartalmazó takarmánykiegészítő termék (Kemin). Porlasztásos, fagyasztásos technikával állítják elő. A kapszulázott formának köszönhetően egyenletesen oldódik és szívódik fel a bélben, ezáltal eljut a vékony- és vastagbélbe, s ott lokálisan tudja kifejteni jótékony, hozamnövelő hatásait.

Az alternatív hozamfokozók használata azután vált számottevővé, miután az Európai Unió 2006. január 1-jén betiltotta a korábban széles körben elterjedt antibiotikumok használatát termelésfokozásra (Phillips, 2007). Ennek egyik oka az volt, hogy összefüggésbe hozták azt, az Európában kimutatott, terjedő antimikrobiális szelektív rezisztenciával. Továbbá fontossá vált, hogy Európa-szerte maradékanyagoktól mentes, egészséges állati termékeket (hús, tej, tojás) állítsanak elő. Ez a rendelkezés azonban az iparszerű állattartásban jelentős visszaesést okozott, ugyanis korábban a nem megfelelő technológiából, higiéniából eredő termeléseszköket tudták az antibiotikumokkal ellensúlyozni. Az antibiotikumok használatának elve az volt, hogy fenntartotta a bélflóra egyensúlyát, ezért javulást eredményezett a fajlagos takarmány felhasználásban, így az élelmezésre szánt állati termékek előállítására gazdaságosabb volt. Ezt a kiesést részben lehetne pótolni alternatív hozamnövelő szerekkel, mint például a butirát.

A nagyüzemi állattartás egyik jelentős problémája, hogy rövid idő alatt sok állatot nevelnek fel, ezért nagy az üzem belüli zsúfoltság. A fiatal állatok bélcsatornája még nem tökéletesen fejlett, s ezzel magyarázható az, hogy fogékonyabbak a kórokozó ágensek ellen. A fakultatív patogénekkal való fertőződés gondot jelent, mely a zsúfoltság miatt könnyen a teljes állomány megbetegedéséhez vezethet. Az ilyen esetekben hatékony takarmánykiegészítő lehet a butirát, mert jelentős antimikrobiális (Warnecke and Gill, 2005) és coccidiumellenes (Leeson *et al.*, 2005; Antongiovanni *et al.*, 2007) hatása van. Továbbá növeli a napi súlygyarapodást (Gálfí és Bokori, 1990), segíti a GALT kialakulását (Friedman *et al.*, 2005), és jótékony változásokat eredményez a bélnyálkahártya szerkezetében (Antongiovanni *et al.*, 2007; Hu and Guo, 2007).

Célkitűzés

A Na-butirátot elterjedten használják alternatív hozamfokozóként szerteágazó pozitív hatásai miatt. Segíti a bélflóra egyensúlyának fenntartását és hipertrófiát eredményez a bélbolyhok felszínén, így növekszik a felszívásra alkalmas felület, és ennek köszönhetően javul a fajlagos takarmányhasznosítás. Korábbi kutatások kimutatták, hogy a butirát epigenetikus hatással is rendelkezik, mely hiszton-hiperacetilációt okoz a májsejtekben, és *in vitro* az mRNS szintjén fokozza a CYP450 enzimek termelődését. A takarmánykiegészítőként alkalmazott Na-butirát *in vivo* csak a génátíródás szintjén eredményezett változást, a májsejtek CYP450 aktivitását nem befolyásolta, így valószínűsíthetően nem módosítja annak méregtelenítő tevékenységét sem. Kiemelendő, hogy kisebb mennyiségben, de a bélben is vannak CYP450 enzimek, melyek akár befolyásolhatják a detoxikációt.

Kutatásunk célja az volt, hogy megvizsgáljuk a CYP450 enzimaktivitást brojlercsirke vékonybelében Na-butiráttal és védett formájú butiráttal (Butipearl) kiegészített kukorica, illetve búza alapú takarmányozás mellett. A Na-butirát a gyomorból képes felszívódni, így a vékony- és vastagbélbeli butirát koncentrációt vélhetően nem befolyásolja. A védett butirát azonban csak a későbbi bélszakaszokból szívódik fel, így a vékonybél lumenében képes lehet megemelni a butirát koncentrációt és lokálisan is kifejteni hatását. A búza és kukorica alapú takarmányozást azért alkalmaztuk, hogy megvizsgáljuk azt, hogy az adott gabonaféléből milyen mennyiségben termelődik endogén módon butirát, és hogy az befolyásolja-e a bélbeli CYP450 enzimek működését. A búza alapú takarmány mellé xilanáz, glükánáz enzimkiegészítést adtunk, hogy elősegítsük a búzában nagy mennyiségben jelenlévő NSP lebontását. A brojlercsirke nem kizárólag modellállatként, hanem a Na-butirát alkalmazását tekintve célállatfajként is szolgált. Feltételeztük azt, hogy a vékonybélben lokálisan ható butirát jobban befolyásolja a CYP450 enzimtermelődést, ugyanis ha megvédjük a Na-butirátot a korai felszívódástól, akkor a vékonybél distalisabb szakaszaiba is eljut, és ezáltal hangsúlyosabbá válhat a biológiai hatás. Mindez megváltoztathatja egyes párhuzamosan használt gyógyszerek farmakokinetikáját, illetve az egyéb xenobiotikumok metabolizmusát. Ezért gazdasági, terápiás és élelmiszerbiztonsági jelentősége is lehet. Befolyásolhatja az élelmezés egészségügyi várakozási idők terjedelmét és a terápiásan alkalmazott gyógyszerek hatásidejét. Mindezt a biztonságos butirát alkalmazáshoz indokolt megismerni, hogy fenn áll-e farmakoepigenetikus interakció.

Anyag és módszer

A kísérleti állatok tartástechnológiája és annak szabályai

A kísérletre szánt 160 darab ROSS 308-as típusú brojlercsirkét a keszthelyi Pannon Egyetem Georgikon Karának Kísérleti Baromfitelepén neveltük fel. A kísérleti állatok nevelése 2013.04.16-án kezdődött és 2013.05.21-ig tartott. Az elhelyezésüket betonpadozatos, almozott ketrecekben biztosítottuk. Az állatokat 35 napig neveltük, majd levágásra kerültek mintavételezés céljára. Az állatvédelmi törvényeket mind a nevelés, mind a leölés során betartottuk.

A kísérleti csirkék takarmányozása a brojlereknél használt háromfázisos rendszer szerint történt; indító takarmánnyal (0-10. napig), nevelőtáppal (11-24. napig) és befejező takarmánnyal (25-35. napig) láttuk el az állatokat. A kísérleti takarmányoknak két alapösszetételét alkalmaztuk az egyes csoportokban. Az alaptakarmányokat (búza, kukorica) különböző formájú butiráttal (Na-butirát és Butipearl) egészítettük ki. Eszerint a kísérleti állatokat hat csoportba soroltuk, amelyeket az **1. táblázatban** tüntettem fel.

1. táblázat: A brojlercsirkék táplálásához használt kísérleti (búza, kukorica) alapú takarmányok hozzáadott butirát tartalma (g/kg). A búza alapú takarmány xilanáz, glükánáz enzimkiegészítést tartalmazott.

Hozzáadott butirát formája	Kukoricával táplált csoportok	Búzával és enzimkiegészítéssel táplált csoportok
nem tartalmazott butirát kiegészítést	kontroll csoport (0g/kg)	kontroll csoport (0g/kg)
Nátrium-butirát	1,5 g/kg	1,5 g/kg
Butipearl (védett, mikrokapszulázott forma)	0,2 g/kg	0,2 g/kg

Az állatok egyik fele klasszikus kukorica alapú csirketápot kapott, a másik fele búza alapú enzimkiegészítéssel. Az enzimkiegészítést tartalmazó takarmányokban az alaptakarmányhoz 0,15 g/kg-nyi xilanáz és glükánáz enzimkeveréket adtunk, mely elősegítette az NSP hasznosulást. A kísérleti takarmányokat úgy állítottuk össze, hogy az energia és nyersfehérje tartalmuk azonos legyen. A takarmány *ad libitum* állt az állatok rendelkezésére, a vízforrást is ugyanilyen módon biztosítottuk a nevelés teljes ideje alatt. A kontroll takarmányok részletes összetétele a **2. táblázatban**, beltartalmi értékei a **3. táblázatban** olvashatók.

A „Butipearl”-t tartalmazó takarmányok speciális mikrokapszulázott, kalcium-butirátot tartalmaztak. A mikrokapszulázás biztosítja, hogy a butirát ne szívódjon fel a gyomorból, annak alacsony pH-jának következtében. Ezáltal egyenletesen tudja leadni a butirát tartalmát, és így nagy mennyiségben jut el a vékony- és vastagbelekbe.

A kísérleti állatok megvilágítását az élet első napján 24 órán át biztosítottuk, majd 7 napig folyamatosan csökkentettük, így a 8. napra 20 órára változott a megvilágítás ideje. Ezt az értéket a 10. napig biztosítottuk, majd a leölés idejéig 16 órás megvilágítást alkalmaztunk.

A relatív takarmányhasznosulás (továbbiakban: FCR) megadja, hogy a felvett takarmányból az állat mennyi terméket (itt: hús) képes előállítani. Ezért megmértük az állatok takarmányfogyasztását és testtömegét az élet első, tizedik, huszonnegyedik és harmincötödik napján. Ezen adatok alapján számoltuk ki az FCR értékét úgy, hogy a súlygyarapodást (kg) elosztottuk a felvett takarmány mennyiségével (kg). Ezt a termelési paramétert sok állandó (genetikailag meghatározott) és változó tényező befolyásolja. A változó tényezők közé tartozik az állatok faja, fajtája, életkora és a takarmányok minősége.

2. táblázat: Az egyes nevelési fázisokban használt keveréktakarmányok összetétele:

(a butirát kiegészítés nincs feltüntetve, Na-butirát kiegészítésnél minden csoportban 1,5 g/kg mennyiségben, védett butirátnál 0,2 g/kg mennyiségben volt hozzáadva a megfelelő anyag, a kontroll takarmány nem tartalmazott butirát kiegészítést) **MCP:** monokalcium-foszfát, **L-Lys:** L-lizin, **DL-Met:** DL-metionin, **L-Thr:**L-treonin,

	Indító		Nevelő		Befejező	
(g/kg)	Kukorica	Búza	Kukorica	Búza	Kukorica	Búza
búza	0,00	300,0	0,00	400,00	0,00	500,00
kukorica	456,00	172,00	519,00	138,00	564,00	88,00
ext.szójadara	351,00	272,00	309,00	204,00	333,00	202,00
fullfat szója	99,00	162,00	79,00	164,00	4,00	109,00
napraforgóolaj	45,00	45,00	50,00	50,00	60,00	60,00
mész	18,00	18,00	15,00	16,00	15,00	15,00
MCP	16,00	15,00	14,00	13,00	13,00	12,00
L-Lys	1,00	2,00	1,00	2,00	0,00	2,00
DL-Met	4,00	4,00	3,00	3,00	2,00	3,00
L-Thr	1,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,00
NaCl	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Na-bikarbonát	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
vit. + min. premix	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00	5,00
Összesen	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00	1000,00

3. táblázat: Az egyes nevelési fázisokban használt keveréktakarmányok beltartalmi értékei:

(a butirát kiegészítés nincs feltüntetve, Na-butirát kiegészítésnél minden csoportban 1,5 g/kg mennyiségben, védett butirátnál 0,2 g/kg mennyiségben volt hozzáadva a megfelelő anyag, a kontroll takarmány nem tartalmazott butirát kiegészítést) **AME_n**: nullanitrogén retencióra korrigált látszólagos metabolizálható energia, **Lys**: lizin, **Met**: Metionin, **Ca**: kalcium, **P**: foszfor

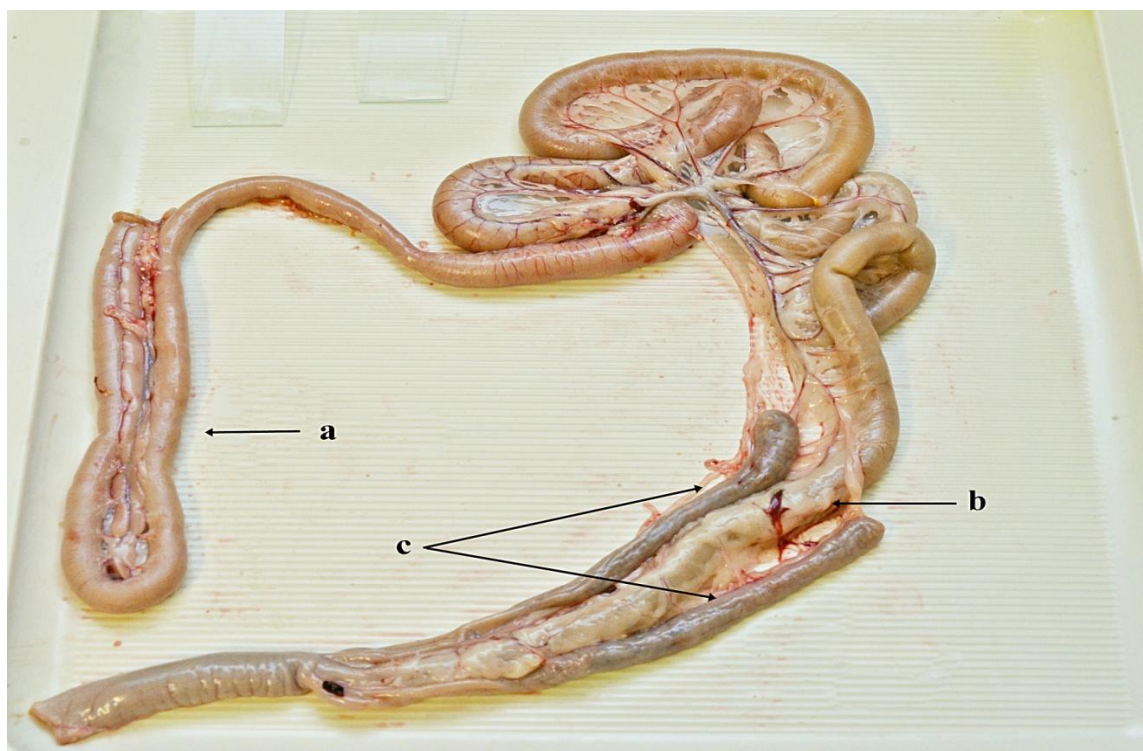
	Indító		Nevelő		Befejező	
	Kukorica	Búza	Kukorica	Búza	Kukorica	Búza
AME_n (KJ/g)=(MJ/kg)	12,60	12,60	13,00	13,00	13,20	13,20
nyersfehérje (g/kg)	220,00	220,00	200,00	200,00	190,00	190,00
nyersrost (g/kg)	31,50	32,44	30,60	31,20	28,74	29,50
nyerszsír (g/kg)	85,00	92,60	85,00	97,20	84,50	96,28
Lys (g/kg)	14,30	14,30	12,40	12,40	11,20	11,20
Met (g/kg)	7,20	7,20	6,20	6,20	5,40	5,40
Ca (g/kg)	10,50	10,50	9,00	9,00	8,50	8,50
emészthető P %	5,00	5,00	4,50	4,50	4,20	4,20

A mintavételezés folyamata

A kísérleti csirkék levágása a nevelés 35. napján történt. A lehető legkisebb szenvedést okozva, az állatvédelmi törvényeknek megfelelően végeztük az állatok leölését. A szén-dioxidos narkózis 5 bar nyomáson történt, mely után az állatok dekapitálására került sor. Következő lépésként felnyitottuk a testüreget, a sternumot előrefejtettük, végül eltávolítottuk a bélcsatorna teljes egészét. A béltraktust jégre helyeztük és úgy dolgoztunk.

A butirát koncentráció meghatározásához csoportonként 10 állatból béltartalom mintát vettünk. A mintavételezés helyéül a duodenum, az ileum és a caecum szolgált **(3. ábra)**. A mintákat Eppendorf csövekbe helyeztük és a mérések elvégzéséig -80°C -on tároltuk.

A bélhám mikroszóma CYP450 aktivitásának meghatározása céljából egyes bélszakaszok nyálkahártyájából is mintát gyűjtöttünk a későbbiekben leírtak szerint.



3. ábra: Brojlercsirke bél. CYP450 enzimaktivitás méréshez mikroszóma (**a**=duodenum), illózsírsav koncentráció méréshez béltartalom (**a**=duodenum, **b**=ileum **c**=caecum) mintavételezési helyei. (saját felvétel)

Az illózsírsav-koncentráció mérése gázkromatográfiás módszerrel

A gázkromatográfiás illózsírsav-koncentráció mérés a keszthelyi Pannon Egyetem Georgikon karán Dr. Wágner László közreműködésével történt.

A gázkromatográfia kalibrációjához 20 mmol/l koncentrációjú standard elegyet használtunk, mely tartalmazott acetátot, propionátot, butirátot, izobutirátot, valeriátot és izovaleriátot. A vékonybél különböző szegmenseiből vett béltartalom mintákat az illózsírsav-koncentráció meghatározásáig -80°C-on tároltuk.

A minták előkészítéséhez a protokollt az Atteh és munkatársai (2008) által leírtak módosításával állítottuk össze a következő módon: a duodenumból és ileumból származó béltartalom mintákból 700 µl-t összekevertünk 150 µl reagenssel, mely 8%-os HCl desztillált vizes oldatot és 1 mg/ml pivalinsavat tartalmazott a belső standardnak megfelelően. A caecum minta előkészítése eltérő módon történt, ott ugyanis 500 µl mintát kevertünk hozzá 600 µl reagenshez, mely összetétele a következő volt: 0,1 mg/ml pivalinsav és 2% HCl desztillált vizes oldata. A gázkromatográfiás készülékbe az előkészített oldatokból 1 µl-t cseppentettünk. A minták injektálása 220°C-on, a detektálásuk 250°C-on történt. A gázkromatográfia során a vivőgáz hélium, a nyomás 83 kPa volt.

A gázkromatográfia során a minta alkotóit a retenciók idejük alapján választottuk el egymástól, detektálásukat a kromatogramon megjelenő csúcsok jelezték. Az egyes komponensek (itt: butirát) koncentrációját a görbe csúcsok alatti területeiből tudtuk kiszámítani.

A bélmikroszóma izolálás módja

Az enterális CYP450 aktivitás meghatározásához bélnyálkahártya mintákat vettünk csoportonként 6 állatból az alábbi módon: közvetlenül a mirigyes gyomor pylorusa után átmetszettük a duodenumot és átmostuk 20 ml PBS-sel. A duodenum proximalis részének 5 cm hosszú részét levágtuk és hosszában felnyitottuk **(3. ábra)**. A duodenum nyálkahártyájának felső rétegét steril tárgylemezzel lekapartuk és 2 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük majd a minták súlyát lemértük és folyékony nitrogénbe helyezve lefagyasztottuk azokat. A mikroszóma izolálás idejéig -80°C-on tároltuk őket, hogy megakadályozzuk a post mortem autolízist azért, hogy a minták enzimaktivitása a mikroszóma izolálás idején ugyanolyan értékű legyen, mint a vágás pillanatában.

A mikroszóma frakciót differenciáló centrifugálással izoláltuk. Első lépésként a mintáinkat felolvasztottuk, és hozzáadtunk 10 ml szacharóz-EDTA oldatot. A szacharóz-EDTA oldat $0,25 \text{ mol/dm}^3$ szacharózt és 5 mmol/dm^3 EDTA oldatot tartalmazott, aminek használata biztosította a megfelelő körülményeket az enzimek számára. Megvédte azokat az esetleges denaturációtól, koagulációtól, illetve egyéb irreverzibilis változástól, mely enzimaktivitás csökkenést eredményezhet. Homogenizátumot készítettünk Potter-féle homogenizátorral, majd azt 600 g-n 1 percig 4°C -on centrifugáltuk, ezzel került kiülepítésre a sejtmag frakció. A centrifugálás során keletkezett felülúszót használtuk fel a bélhámsejtek kefeszegélyének eltávolításához egy újabb centrifugálással 1500 g-n, 10 percen át 4°C -on. Az így kapott felülúszókat használtuk a többlépcsős ultracentrifugáláshoz az MTA Állatorvos-tudományi Kutatóintézetben. A mintákat az egyes lépések között jégen tartottuk, így biztosítottuk azt, hogy az enzimaktivitás az eredeti – a vágás pillanatának megfelelő – maradjon.

Az ultracentrifugálás két lépésből állt. Első lépésként minden mintát 12 000 g-n 15 percig 4°C -on centrifugáltunk, ekkor a mitokondrium frakció került az üledékbe. A második lépés során a felülúszót 105 000 g-n 60 percig 4°C -on centrifugáltuk, amikor végül a mikroszóma és citoplazma frakciót különítettük el. Ennek a végső mintának az üledékét használtuk fel, és 3 ml foszfát puffert adtunk hozzá. A foszfát puffer koncentrációja $0,1 \text{ mol/dm}^3$, a pH-ja 7,4 volt. Ezen kívül tartalmazott még $0,1 \text{ mmol/dm}^3$ -es EDTA-t és 20%-os glicerint. A glicerinnel szerepe az volt, hogy krioprotektív komponensként megakadályozta a mikroszómák sérülését a folyékony nitrogénes fagyasztás során.

Az üledéket a foszfát pufferben óvatosan reszuszpendáltuk, majd homogenizáltuk ultrahangos szonikátorral. Az így kapott szuszpenzióból 800 μl -t pipettáztunk az egyes Eppendorf csövekbe. Ezeket a mintákat is folyékony nitrogénnel történő „shock-freezing” alá vetettük, majd -80°C -on tároltuk.

A CYP450 enzimaktivitás mérésének módszere

Mikroszómális összfehérje-koncentráció meghatározás BCA módszerrel

A BCA (bicinchoninsavas) fehérje meghatározási módszer elméleti alapja az, hogy a mérni kívánt fehérje a réz (II)-iont réz (I)-ionná redukálja. Az oldatban a réz (II)-szulfát felel a mérhető színváltozás kialakulásáért. A réz (I)-ion kimutatására szolgál a bicinchoninsav komponens a BCA reagensben, mely tartalmaz nátrium-bicinchoninátot, nátrium-karbonát-monohidrátot, nátrium-tartarátot, nátrium-hidroxidot és nátrium-hidrogén-karbonátot.

Első lépésként hígítási sort készítettünk a standard sorhoz 2 mg/ml-es BSA (szarvasmarha szérum albumin: fehérje kontroll) törzsoldatból. Ezt követően bemértük a standard sor elemeit és 200 µl BCA reagenst a microplate lemez minden lyukába. Az előbbieken leírt differenciáló centrifugálással izolált mikroszóma mintákból 25 µl-t mértünk be a microplate lemez reagenst már tartalmazó mélyedéseibe. Minden mintából és standardból 3 párhuzamos sort készítettünk. A bemérések befejeztével a microplate lemezt 37°C-os termosztátba helyeztük 30 percre, majd szobahőmérsékleten lehűtöttük és megmértük az abszorbanciát ELISA olvasóval 562 nm-en.

A kapott értékekből a fehérje koncentrációt a standardsor segítségével számoltuk ki. A koncentráció és az abszorbancia egyenesen arányos egymással, így a mérési pontokra lineáris regresszióval egyenes illeszthető. Az egyenes egyenletének segítségével számítottuk ki (β_i jelölje az i -edik pont helyvektorát, ezek alapján a lineáris kapcsolat: $y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \dots + \beta_k x_k + u = X\beta + u$) az egyes mikroszóma minták fehérje koncentrációját.

Aminopirin-N-demetilációs próba (Nash protokoll szerint)

Az aminopirin-N-demetilációs enzimkinetikai spektrofotometriás vizsgálattal a mikroszómális CYP3A és CYP2C típusú enzimek aktivitását mértük meg. A spektrofotometriás vizsgálati protokollt a García-Agúndez és munkatársai (1990) által leírtak módosításával állítottuk össze.

Az abszorbancia mérése a reakció során keletkező formaldehid miatt válik lehetővé. A CYP3A és CYP2C alcsaládba tartozó enzimek működéséből adódóan ugyanis a dimetil-aminoantipirin (továbbiakban: aminopirin) monometil-aminoantipirinné alakul át. Az abból kilépő metilcsoport víz felhasználásával formaldehiddé alakul, mely arányos az enzimaktivitással. Az így keletkezett formaldehid mérésére került sor Nash (1953)

módszerével. A formaldehid két acetilaceton és egy ammónia molekulával 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidin vegyületté alakul át. A képződött molekula sárga színű, mert konjugált kettőskötés rendszert tartalmaz. A színes vegyületek koncentrációja kvantitatívan, fotometriás módon mérhető, itt 415 nm-es fényelnyelési maximumot használtunk.

4. táblázat: Az aminopirin-N-demetilációs mérés lépései:

„A”, „B”: párhuzamos sorok, **Gátolt sor** : negatív kontroll csoport, **RV**: Reagensvak, **PP**: Foszfát puffer, **KM**: Kofaktor mix, **AP**: aminopirin oldat(különböző koncentrációkban: 0mmol/l, 1,25 mmol/l, 2,5 mmol/l, 5mmol/l, 10mmol/l) **TCA**: Triklórecetsav

Az eppendorf csövek számozása			
„A” sor	„B” sor	Gátolt sor	Reagensvak
x/1	x/2	x/3	-
x/4	x/5	x/6	-
x/7	x/8	x/9	-
x/10	x/11	x/12	x/RV
x/13	x/14	x/15	-
1.lépés	150 µl foszfát puffert mértünk be minden eppendorf csőbe.		itt: 250 µl PP
2.lépés	50 µl kofaktor mixet mértünk be minden eppendorf csőbe.		
3.lépés	50 µl TCA-t mértünk be a gátolt sor eppendorf csőveibe.		
4.lépés	50 µl megfelelő koncentrációjú AP oldatot mértünk be minden eppendorf csőbe, majd vortexeltük azokat.		50 µl AP 5mmol/l
5.lépés	37°C-os előinkubálás után, 100 µl mikroszóma mintát mértünk minden eppendorf csőbe,		nem mértünk mikroszómát hozzá
6.lépés	Egy 37°C-os inkubálást végeztünk 10 percig.		37°C 10 perc
7.lépés	50 µl triklór-ecetsavat pipettáztunk az „A” és „B” sor eppendorf csőveibe, a keverés vortexxel történt.		itt: 50 µl TCA
8.lépés	Ezt egy 10 perces centrifugálás 2260 g-n követte.		
9.lépés	300 µl felülúszót vittünk át egy új Eppendorfcső garnitúrába, a korábbi számozásnak megfelelően címkéztük fel.		
10.lépés	150 µl Nash-reagenst adtunk minden eppendorf cső tartalmához, vortexxel elkevertük a mintákat		
11.lépés	A végső inkubáció 60°C-on 30 percig tartott, hűtés után abszorbancia mérés.		

Állatonként 1500 µl mikroszóma mintát használtunk a vizsgálathoz. Három sorban mértük az enzimaktivitást különböző aminopirin szubsztrát koncentrációk és mikroszóma minták hozzáadásával. Az első két úgynevezett „A” és „B” sorban (párhuzamos ismétlések) 5-5 db Eppendorf csövet használtunk, melyekbe bemértünk foszfát puffert, kofaktor mixet, aminopirint a megfelelő koncentrációban (0 mmol/l, 1,25 mmol/l, 2,5 mmol/l, 5 mmol/l, 10 mmol/l), majd hozzáadtuk mindegyikhez a bélmikroszóma mintákat. (A részletes mennyiséget és lépéseket a **4. táblázat** tartalmazza.) Ezt követően 37°C-on 10 percig inkubáltuk a mintákat, majd triklórecetsavat (továbbiakban: TCA) adtunk az elegyhez, hogy

leállítsuk az enzimátikus reakciót. A kicsapódott fehérjét 10 perces 2260 g centrifugálással üleptettük ki.

A centrifugátum felülúszójának 300 μ l-éhez adtuk hozzá a Nash reagenst, majd forró (60°C-os) vízfürdőbe helyeztük (részletes lépések a **4. táblázat**ban olvashatók). A félórás inkubáció letelte után a vizsgálandó mintákat jégen lehűtöttük, és megmértük az abszorbanciát 415 nm-en.

A nem specifikus fényelnyelés kiküszöbölése céljából a méréshez egy „gátolt” sort is készítettünk, mely negatív kontrollként szolgált. A gátolt sor lényege az volt, hogy minden lépés megegyezett az „A” és „B” sor lépéseivel, azzal a különbséggel, hogy a foszfát puffer és a kofaktor mix hozzáadása után TCA-t adtunk az elegyhez. Ennek eredményeként a hozzáadás pillanatában denaturálódtak a CYP 450 enzimek, így az inkubáció alatt már nem tudták a hatásukat kifejteni.

A relatív abszorbancia értékek kiszámítására azért volt szükség, hogy a pontos formaldehid koncentrációkat meg tudjuk határozni. Ezt úgy számítottuk ki, hogy a gátolt sor abszorbancia értékeket kivontuk az aktív „A” és „B” sorok abszorbanciájának átlagából, majd az így kapott eredményből kivontuk a 0 mmol/l-os aminopirin koncentrációnál kapott értéket. A különböző koncentrációjú aminopirin oldatok hozzáadása során keletkezett formaldehid koncentrációt a relatív abszorbancia értékekből ismert formaldehid koncentrációjú standard sor segítségével számoltuk ki, a fehérje meghatározásnál ismertetett módon. Az így kapott koncentrációt elosztottuk az adott mikroszóma összfehérje-koncentrációjával és a 10 perces inkubálási idővel, mert enzimaktivitás alatt azt a produktum mennyiséget értjük, amit 1 gramm fehérje 1 perc alatt termel. Az átlagos CYP450 enzimaktivitást az egyes állatokból származó mintákból, a különböző aminopirin koncentrációk hozzáadása során mért enzimaktivitás átlagaként határoztuk meg.

Statisztikai módszerek

Az eredmények kiértékelése az R program 2.14.1-es verziójával történt. A táblázatokban és az ábrákon az eredményeket átlag $\pm$ standard hiba formában adtuk meg. Az adatok eloszlását hisztogram segítségével vizsgáltuk, ahol indokolt volt, ott az elemzéseket az értékek 10-es alapú logaritmusaival végeztük. Az átlagokat két utas ANOVA-val, ezt követően páronként Dunnett Post Hoc tesztel hasonlítottuk össze. A kontroll csoporttól való eltérést szignifikánsnak értelmeztük, ha $p < 0,05$, illetve nem szignifikáns trendnek, ha $p < 0,1$ értékű volt.

Eredmények

Termelési paraméterek

A testtömeget megvizsgálva azt kaptuk, hogy az általunk alkalmazott takarmányozási rendszerben a butirát kiegészítés sem védett (Butipearl), sem Na-butirát formában nem eredményezett növekedést a testtömeg-gyarapodásban a butiráttal nem kiegészített megfelelő csoporthoz képest. A takarmány NSP tartalmának azonban volt hatása a testtömegre, az enzimmel kiegészített búza alapú takarmánnyal táplált állatok szinte a teljes kísérleti időszak alatt nagyobb tömegűek voltak, és a növekedési periódus kezdetén nagyobb volt az időközönkénti testtömeg gyarapodásuk is, mint a kukoricával tápláltaknak (5. táblázat). Habár a kukoricával táplált állatok napos korban nagyobb tömegűek voltak, mint amelyek búzát ettek, ez a különbség már a tizedik napra megfordult, és ezt az előnyt a búza alapú takarmányozású csoport tartotta is, egészen a vágás napjáig. Az FCR értékeket kiszámítva is látható a különbség: a búzával ellátott csoportokban a tizedik nap után mindig alacsonyabb volt az FCR értéke, mint a kukoricával tápláltaknál (6. táblázat).

5. táblázat: Testtömeg gyarapodás a takarmányozási csoportok és az idő függvényében:

Mivel a butirát kiegészítésnek nem volt hatása a testtömeg gyarapodásra, ezért a táblázatban az azonos takarmányozású csoportokat összevontan ábrázoltam (grammban megadva $\pm$ standard hiba,

$n_1=25$ db állat /csoport; $n_2= 75$ db állat /takarmány típus # $P<0,1$; * $P<0,05$; ** $P<0,01$; *** $P <0,001$).

A szignifikancia a kétféle takarmányozási csoport közötti különbségre vonatkozik

Takarmánycsoportok	Kukorica	Búza + enzim	Testtömeg (p)	Gyarapodás (p)
naposcsibe (g)	40,1 $\pm$ 0,3	39,5 $\pm$ 0,2	0,045 *	-
10. nap (g)	243,3 $\pm$ 5,3	256,5 $\pm$ 4,4	0,057 #	0,046 *
24. nap (g)	1153,2 $\pm$ 19,1	1246,1 $\pm$ 18,9	<0,001 ***	0,003 **
35. nap (g)	2261,6 $\pm$ 31,9	2421,1 $\pm$ 34,0	0,001 ***	0,153

6. táblázat: Az FCR értékek változása a takarmányozási csoportok és az idő függvényében:

Mivel a butirát kiegészítésnek nem volt hatása a testtömeg gyarapodásra, ezért a táblázatban az azonos

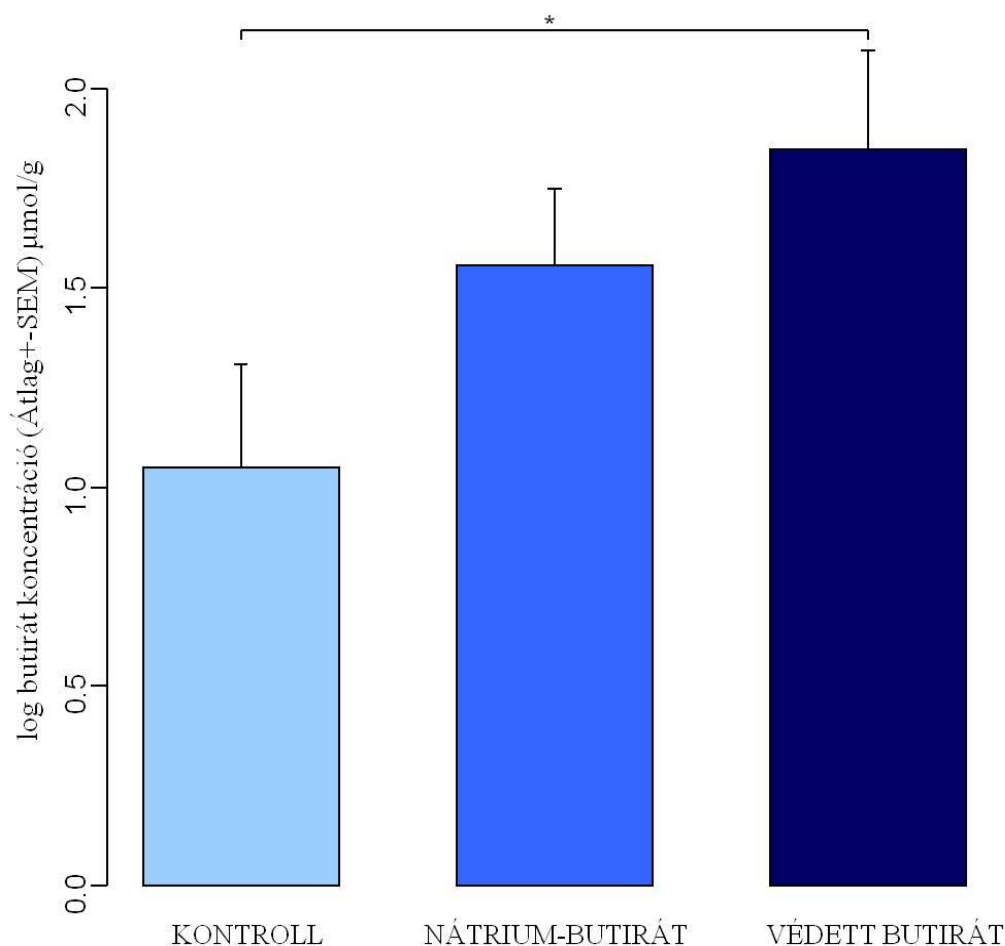
takarmányozású csoportokat összevontan ábrázoltam ($n_1=25$ db állat /csoport; $n_2= 75$ db állat /takarmány típus).

FCR (kg/kg)	Kukorica	Búza + enzim
0-10. nap	1,23	1,23
10-25. nap	1,50	1,42
25-35. nap	1,81	1,76

A butirát tartalmú takarmánykiegészítők és a takarmány NSP tartalmának hatása a duodenum, az ileum és a caecum béltartalmának butirát koncentrációjára

Az illózsírsav-koncentrációt gázkromatográfiás módszerrel mértük meg a duodenumban, az ileumban és a caecumban. A duodenumban a butirát koncentrációt nem befolyásolta a takarmány összetétele (takarmányozási csoportok), de a különböző takarmánykiegészítések igen. A kontroll csoporthoz viszonyítva a védett butirát a duodenum lumenében szignifikáns ($p=0,035$) butirát koncentráció emelkedést eredményezett. A Na-butirát kismértékű növekedést okozott, de ez a változás nem volt szignifikáns (**4. ábra**).

DUODENUM

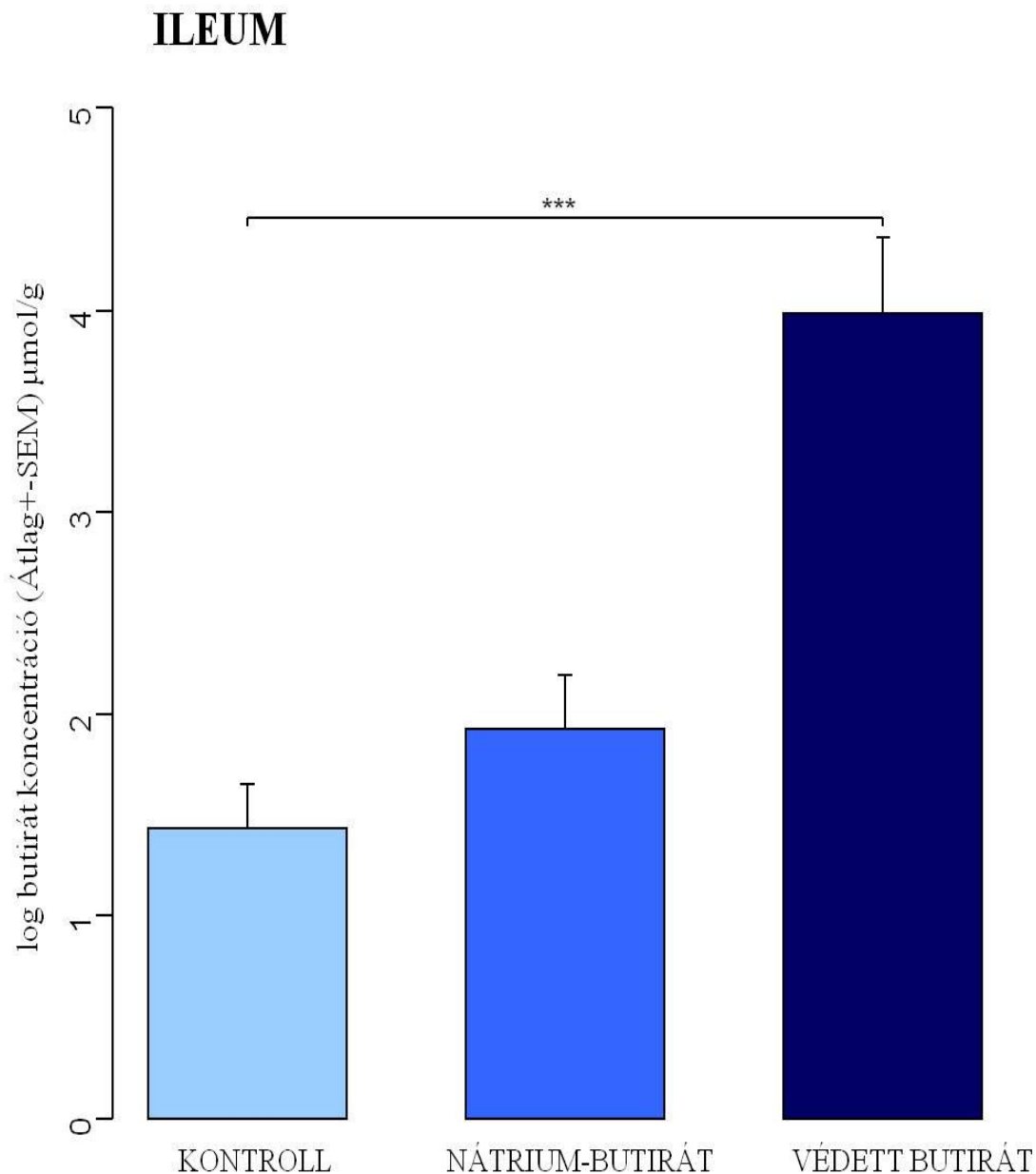


4. ábra: A butirát koncentráció változása a duodenumban különböző butirát kiegészítések hatására.

Mivel a takarmány típusának nem volt hatása a butirát koncentrációra, ezért az ábrán az azonos butirát kiegészítésű csoportokat összevontan ábrázoltam. Mérés: gázkromatográfiás módszerrel; Mértékegység: $\mu\text{mol/g}$

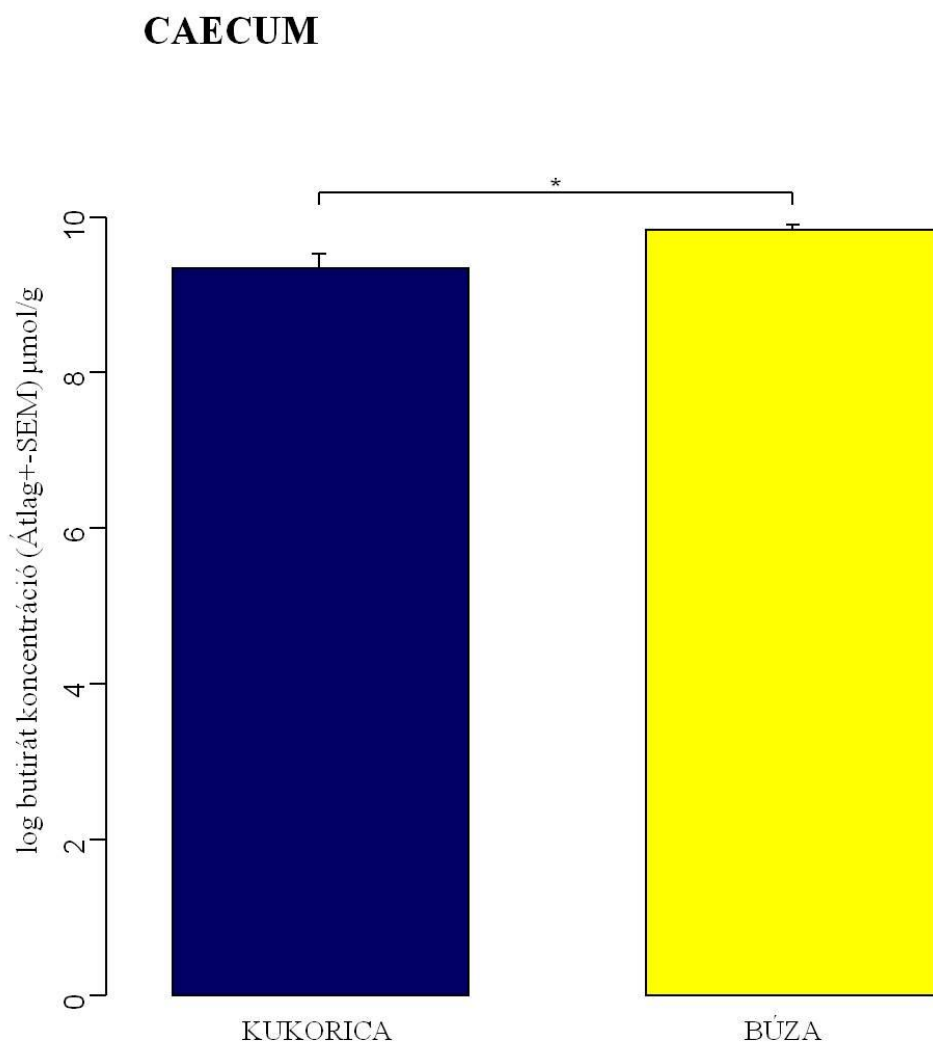
($n_1=10$ db állat /csoport; $n_2=20$ db állat /kiegészítés típus) $P^*<0,05$

Az ileumban a duodenumhoz hasonlóan csak a takarmánykiegészítés okozott változást a butirát koncentráció tekintetében. A kontroll csoportot összehasonlítva a védett butirát kiegészítést kapott állatok csoportjával a koncentráció emelkedés itt is szignifikáns ($p < 0,001$) volt. A Na-butirátnak ezen a bélszakaszon nem volt hatása (5. ábra).



5. ábra: A butirát koncentráció változása az ileumban különböző butirát kiegészítések hatására. Mivel a takarmány típusának nem volt hatása a butirát koncentrációra, ezért az ábrán az azonos butirátkiegészítésű csoportokat összevontan ábrázoltam. Mérés: gázkromatográfias módszerrel; Mértékegység: $\mu\text{mol/g}$ ($n_1=10$ db állat /csoport; $n_2=20$ db állat /kiegészítés típus) *** $P < 0,001$

A gázkromatográfiás mérések eredményeként azt kaptuk, hogy az ileumban ($p < 0,001$), és a dudenumban ($p = 0,049$) a butirát kiegészítésnek volt hatása. Ezzel szemben a caecumban a takarmány befolyásolta a butirát képződést. A vizsgálatunkból kiderült, hogy a búza alapú takarmányozás hatására szignifikánsan ($p = 0,023$) több illózsírsav keletkezik a caecumban, mint a kukorica alapú takarmányozásnál. (6. ábra).



6. ábra: A butirát koncentráció változása a caecumban kukorica és búza alapú takarmányozás hatására. Mivel a butirát kiegészítésnek nem volt hatása a butirát koncentrációra, ezért az ábrán az azonos takarmányozású csoportokat összevontan ábrázoltam. Mérés: gázkromatográfiás módszerrel; Mértékegység: $\mu\text{mol/g}$ ($n_1=10$ db állat /csoport; $n_2=30$ db állat /takarmányozás típus) * $P < 0,05$

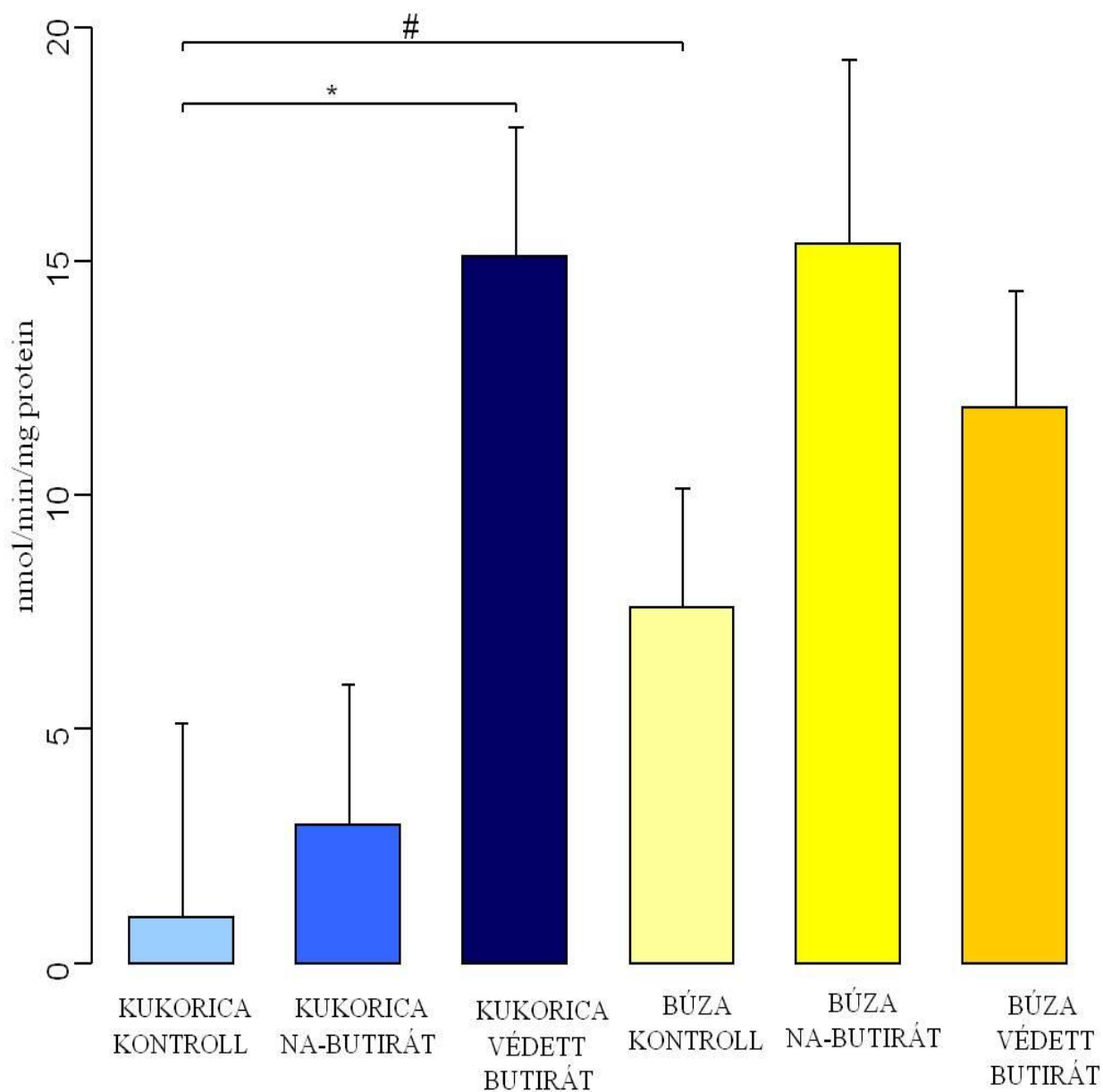
Átlagos enzimaktivitás mérés aminopirin-N-demetilációs módszerrel

A CYP3A4 és a CYP2C enzimcsaládok aktivitását aminopirin-N-demetilációs módszerrel mértük meg, melynek eredménye a különböző csoportokban lényeges eltéréseket mutat. A kukoricával takarmányozott kontroll csoport vékonybélbeli átlagos CYP450 enzimaktivitása minimális volt. Ezzel szemben a búzával és enzimkiegészítéssel etetett kontroll csoportban az átlagos enzimaktivitás trendszerűen megemelkedett ($p=0,086$) és a kukoricával etetett kontroll csoport eredményeinek megközelítőleg a háromszorosa lett **(7. ábra)**.

A kukoricával takarmányozott csoportoknál a Na-butirát nem okozott mérhető változást. Azonban a védett butirát szignifikáns ($p=0,018$) emelkedést eredményezett, ebben a csoportban az átlagos enzimaktivitás a kontroll csoport eredményeihez képest több, mint ötszöröse volt **(7. ábra)**.

A búzával táplált állatok csoportjaiban is megvizsgáltuk a Na-butiráttal és a védett butiráttal kiegészített takarmányozás hatásait a vékonybélbeli CYP450 átlagos aktivitására. Eredményként azt kaptuk, hogy nem okoz számottevő emelkedést sem a Na-butirát, sem a védett butirát kiegészítés **(7. ábra)**.

CYP450 ÁTLAGOS AKTIVITÁS



7. ábra: A vékonybélben lévő CYP450 enzimek átlagos aktivitási értékei a különböző takarmánnyal ellátott csoportokban.

Enzimaktivitás mérése: aminopirin-N-demetilációs módszerrel Nash protokoll szerint.

(n= 6 db állat/ csoport) *P <0,05, #P <0,1

Megbeszélés

A vizsgálatunkból kiderült, hogy a mi modellünkben, ennél a takarmányozásnál, ilyen butirát adagolásnál és alkalmazási formánál a butirát kiegészítésnek a testtömeg növekedésre nem volt hatása, de a takarmány összetételének igen. Eredményként azt kaptuk, hogy a búza alapú takarmány hozzáadott enzim (xilanáz és glükánáz) kiegészítéssel jobb növekedési paramétereket mutatott, mint a kukorica alapú takarmány. Ennek oka az lehet, hogy az enzimek segítik a búzában található NSP vegyületek oligoszacharidra bontását, amely a vastagbélflóra számára gyorsan fermentálható szubsztrát. Ezért, ha enzimkiegészítéssel támogatjuk a nagyobb mennyiségű oligoszacharid képződést, akkor több jut el a vastagbélbe és a bakteriális fermentáció eredményeként vélhetően gyorsabban, több endogén butirát fog keletkezni. Enzimkiegészítés nélkül valószínűleg kevesebb lett volna az NSP-ből termelődött illózsírsavak mennyisége. A megnövekedett endogén butirát koncentráció magyarázhatja a búzával táplált állatok testtömeg-gyarapodását. Ugyanis a butirát elsődleges energiaforrás a colonocyták számára (Velázquez *et al.*, 1997), fokozza az enterocyták regenerációját és proliferációját (Roediger, 1982), segíti a vastagbélflóra egyensúlyának fenntartását (Warnecke and Gill, 2005; Van Immerseel *et al.*, 2005; Fernández- Rubio *et al.*, 2008) és gyorsítja a GALT kialakulását (Friedman *et al.*, 2005). Ezeknek a tényezőknek fontos szerepe van az állatok növekedése során, mert biztosítják az elegendő mennyiségű energiát és az immunrendszer megfelelő működését, mely védelmet nyújt a patogén kórokozókkal szemben.

A méréseink során arra kerestük a választ, hogy mi befolyásolja az illózsírsav-koncentráció emelkedését. A duodenum- és ileumbeli butirát koncentrációra a takarmány összetételének, illetve NSP tartalmának nem volt hatása, de a butirát kiegészítésnek igen. A butirát kiegészítések közül is kizárólag a védett formájú butirát okozott szignifikáns koncentráció emelkedést. Ugyanis a Na-butirát a mirigyes gyomor alacsony pH-ján nem disszociált, lipofil formában van, ezért könnyen és gyorsan felszívódik, így a vékonybélbe már nem tud eljutni számottevő mennyiségben. A védett butirát egy speciális gyomorsavnak ellenálló mikrokapszulában van, mely megvédi a gyomorból történő felszívódástól, ezért a Na-butiráttal ellentétben nagyobb arányban kerül a vékonybélbe.

A duodenum és az ileum lumenében a kontroll csoport és a Na-butiráttal kiegészített közel hasonló értéket adott, de a védett butiráttal kiegészített csoport eredményei nagy különbséget mutatnak. A duodenumban a Na-butirát kisebb emelkedést okozott, de ez az érték nem volt szignifikáns. Az ileumban a védett butiráttal kezelt csoportban jóval magasabb

volt a mért butirát koncentrációja, mint a duodenumban. A védett butirát ugyanis a duodenumba ürülő emésztőenzimek hatására szabadul fel fokozatosan, így a felszabaduló butirát mennyisége és a bélbeli koncentrációja nagyobb lehet a vékonybél distalisabban helyeződő szakaszaiban például: az ileumban.

A caecumtartalmat megvizsgálva eltérő eredményt kaptunk, mint az ileum- és duodenumtartalomnál. A caecumban ugyanis a takarmányozás befolyásolta szignifikáns mértékben a butirát koncentrációt. A koncentráció emelkedést az enzimkiegészítéssel rendelkező búza alapú takarmány okozta. A butirát kiegészítéseknek egyik formában sem volt mérhető hatása, mert a Na-butirát és a védett butirát is egyaránt felszívódik a korábbi bélszakaszokból, így a caecumba már nem tud eljutni. A búza alapú takarmány sok NSP-t tartalmazott, mely az enzimkiegészítések hatására jobban tudott hasznosulni, ezért a caecum kolonizáció nagyobb mennyiségű butirátot tudott termelni ebből a fajta takarmányból, mint a kukorica alapúból.

Következtetésként levonható, hogy a különböző bélszakaszokban különböző módon adott butirát hat. A proximális vékonybél szakaszokban, mint a duodenum vagy az ileum, az exogén módon adott butirát kiegészítés okoz butirát koncentráció emelkedést. Ezzel szemben a distalisabban helyeződő caecum területén, az endogén módon, NSP vegyületekből keletkező butirát emeli meg a butirát koncentrációt. A különböző bélszakaszokban a butirát hatásai is eltérőek. Az ileum és a duodenum területén a bélhámsejtek (Roediger, 1982) és a Lieberkühn-kripták (Antongiovanni *et al.*, 2007) morfológiáját változtatja meg, míg a caecumban a mikrobiális flóra fenntartását segíti (Warnecke and Gill, 2005; Van Immerseel *et al.*, 2005; Fernández- Rubio *et al.*, 2008). Tehát figyelembe kell venni, hogy hol szeretnénk, hogy a butirát jótékony hatásait kifejtse, és ez alapján kell kiválasztani az ennek megfelelő módú alkalmazást.

Az átlagos CYP450 (CYP3A, CYP2C) enzimaktivitást aminopirin-N-demetilációs módszerrel (Nash) mértük meg. A CYP450 enzimaktivitása a májban a legnagyobb mértékű, ugyanis ez a detoxikáció elsődleges szerve, de a bélben is kimutatható ezen enzimek jelenléte. A SZIE ÁOTK Élettani és Biokémiai Tanszék kutatásai során igazolta, hogy a májbeli CYP450 enzimek aktivitására nem fejt ki hatást a butirát. A májban a CYP450 enzim értéke a kontroll csoportban 75 nmol/perc/mg protein volt (Pleva, 2012), ezzel szemben a bélben a kukoricával etetett állatoknál kb. 1 nmol/perc/mg protein, a búzával tápláltaknál pedig

7 nmol/perc/mg protein. A Na-butirát sem a májban, sem az általunk vizsgált bélszakaszon nem okozott szignifikáns változást a CYP450 enzimek átlagos aktivitásában

Az eredményeink azt mutatják, hogy a CYP450 enzimaktivitás szintjén a májjal ellentétben a vékonybélben van hatása a butirátoknak. A butirát védett formája szignifikáns átlagos CYP450 (CYP3A, CYP2C) enzimaktivitás emelkedést okoz. Ennek oka feltételezhetően az, hogy a májba a butirát a vérkeringésen keresztül jut el, így időközben a butirát felhasználásra kerül egyéb metabolikus folyamatokban, mint például a ketogenezis vagy a β -oxidáció. Ezért a májba már nem a felszívódott eredeti mennyiség jut el, hanem annak csak egy része. Ezzel szemben a gyomorból a védett butirát alkalmazásakor, csökken a felszívódás, ezért nagyobb mennyiségben jut el és szabadul fel a vékonybélben, ahol így lokálisan tudja kifejteni a bélhámsejtekre epigenetikus és receptormediált hatását. Feltételezzük azt, hogy a helyi hatás mellett a szisztémás keringési rendszer által is kerülhet butirát a bélhámsejtekhez. Vélhetően a szisztémás keringésen keresztül indirekt módon is kifejtheti hatásait a butirát különböző mediátorok aktiválásával. Ebből adódóan a helyi, a direkt és az indirekt szisztémás hatás együttesen eredményezhette a szignifikáns növekedést.

A szignifikáns átlagos CYP450 enzimaktivitás emelkedést vizsgálatunkban csak kukorica alapú takarmányozás mellett lehetett igazolni. A búza alapú takarmányozás mellett a védett butirát nem okozott szignifikáns emelkedést. A lehetséges magyarázat erre az, hogy a búza alapú takarmány enzimekkel volt kiegészítve, melyek segítették az NSP hasznosulást. A búzával és kukoricával táplált kontroll csoportok értékeit összehasonlítva a búzával táplált csoportoknál nagyobb butirát koncentráció volt jelen a caecumban, mint a kukoricával tápláltaknál, ami a szisztémás keringésbe felszívódva el tudott jutni a vér útján a duodenum sejtjeihez és így vélhetően az ottani CYP450 enzimek átlagos aktivitását is meg tudta emelni. Az enzimaktivitás növekedése telítődési görbe szerint történik, ez azt jelenti, hogy egy adott felső korlát fölé nem tud emelkedni. A búzára alapozott takarmányozás kontroll csoportjának értékei a telítődési görbe inflexiós pontja mögött helyeződnek, így az exogén módon adott Na-butirát és védett butirát kiegészítés már nem tud szignifikáns enzimaktivitás emelkedést okozni. Ezzel szemben a kukorica alapú takarmányozás kontroll csoportjának értékei a görbe inflexiós pontja előtt, a kezdeti lassú növekedés területén helyezkednek el, ami miatt a gyors felfutási szakasz során szignifikáns mértékű emelkedés igazolható.

A védett butirát által megemelkedett átlagos enzimaktivásra a magyarázat az, hogy a duodenumban és az ileumban védett butirát hatására megnőtt a butirát koncentráció, ezért a butirát ki tudta fejteni epigenetikus hatását.

A védett butirát kiegészítés használata a nagyüzemi állattartásban és a takarmányozásban az eredményeink alapján újabb élelmiszerbiztonsági és gazdasági kérdéseket vet fel. A CYP450 enzimek felelősek a xenobiotikumok biotranszformációjáért. Tehát az egyidejűleg alkalmazott védett butirát és bármely olyan gyógyszer, mely a CYP450 enzimek által eliminálódik a szervezetből farmakoepigenetikus kölcsönhatásba léphet. A megnövekedett CYP450 enzimaktivitásnak lehetnek pozitív és negatív hatásai.

Pozitív hatásként a gazdasági jelentőség említhető. A butirát által megnövelt CYP450 enzimaktivitás a gyógyszerek gyorsabb metabolizációját és eliminációját eredményezheti, melyre így akár rövidebb élelmezés egészségügyi várakozási időt lehetne megállapítani, ami jelentős költségcsökkenést eredményezhetne az élelmezésre szánt állati termékek előállítása során.

A bélben megnövekedett CYP450 enzimaktivitás negatív hatásai az állategészségügyben nyilvánulhatnak meg, mert az alkalmazott gyógyszerek farmakokinetikáját befolyásolhatják. A gyógyszer metabolizmusbeli first-pass feltételezhetően a bélben elkezdődik, így az ott lokalizálódó CYP450 enzimek megkezdik azok lebontását, még mielőtt a terápiás hatás kifejeződhetne. A védett butirát kiegészítés mellett a bélbeli CYP450 enzimaktivitás megnő, ezért valószínűsíthető, hogy a bélből csekélyebb mennyiségű hatóanyag jut a keringésbe, mint amennyi a hatásos gyógykezeléshez szükséges lenne. Ezért az egyidejű védett butirát, és a szájon át adott gyógyszeres kezelések alkalmazása során indokoltá válhat az addig alkalmazott dózisok esetleges módosítása a kívánt terápiás hatások eléréséhez. A CYP450 enzimek jelenléte a vékonybélben (1-7 nmol/perc/mg fehérje) a májhoz (75 nmol/perc/mg fehérje) (Pleva, 2012) képest jóval csekélyebb, a mennyiségük és az aktivitásuk is alacsonyabb. Továbbá egyetlen vizsgálati módszerrel (aminopirin-N-demetilációs módszer) egyes CYP450 enzimeket (CYP3A, CYP2C) vizsgáltunk, így nem biztos, hogy ez a hatás általános érvényű minden CYP450 enzimre. Ezek miatt a lehetséges gazdasági, állategészségügyi és farmakológiai hatások esetleges gyakorlati jelentőségének megállapítására további vizsgálatok szükségesek.

Összefoglalás

A takarmányhoz kevert Na-butirátot széleskörű, jótékony hatásai miatt gyakran használják hozamfokozóként nagyüzemi csirke- és sertéstelepeken. Epigenetikus hatása révén egyes enzimek termelődését a transzkripció szintjén fokozhatja. Korábbi vizsgálatok igazolták, hogy a butiráttal kiegészített takarmány befolyásolta a máj méregtelenítő tevékenységében jelentős szerepet játszó citokróm P450 (CYP450) enzimek génexpresszióját, viszont azok aktivitásában nem okozott változást. A máj enzimmérendője mellett egyre nagyobb jelentőséget tulajdonítanak a vékonybélben található CYP450 enzimeknek is. A per os adott butirát a májsejtekhez képest a bélnyálkahártya sejteire közvetlenebben fejtheti ki hatását, ezért feltételeztük, hogy az enterális citokrómok aktivitását is jobban tudja befolyásolni.

Vizsgálatunkban ROSS 308 típusú brojlercsirkéket kukorica vagy búza alapú takarmánnyal etettünk, mely az endogén butirát termelést befolyásolja, Na-butirát vagy védett butirát kiegészítésekkel, illetve butirát kiegészítés nélkül (kontroll csoport). Az állatok leölését követően a duodenum-, az ileum- és a caecumtartalomtól mintát vettünk, amikből gázkromatográfiás módszerrel határoztuk meg a butirát koncentrációt. A duodenum nyálkahártyájából származó mintából, az enterocyták differenciáló centrifugálása révén, izoláltuk a mikroszóma frakciót, melyből a bélben legjellemzőbb CYP450 enzimek (CYP3A, CYP2C) átlagos aktivitását aminopirin-N-demetilációs módszerrel határoztuk meg.

Eredményeink azt mutatták, hogy a duodenumban és az ileumban a béltartalom butirát koncentrációja csak a védett butirát, míg a caecumban a búza alapú takarmány hatására növekedett. A CYP450 enzimaktivitást tekintve a kukorica alapú takarmányozásnál a Na-butirát kiegészítésnek nem volt hatása, míg a védett butiráttal kiegészített csoportnál közel ötszörös enzimaktivitás emelkedést tapasztaltunk a bélnyálkahártya hámsejtjeiben. A búza alapú takarmányozásnál az enzimaktivitás kis mértékben magasabb volt a kukorica alapúhoz viszonyítva, így ahhoz képest már sem a Na-butirát, sem a védett butirát nem okozott emelkedést.

Mindezek szerint, a per os adott védett butirát sokkal jobban megemeli a duodenumban az átlagos CYP450 enzimaktivitást, mint a Na-butirát. Ennek oka az, hogy a Na-butirát már az emésztőcső első szakaszából felszívódik, ezzel szemben a védett forma csak a későbbi szakaszban. Ezért a duodenumban viszonylag nagy mennyiségben lehet jelen, befolyásolva ezzel a CYP enzimek expresszióját. Ebből következően feltételezhető, hogy a védett butirát befolyásolhatja az egyidejűleg alkalmazott gyógyszerek és egyéb xenobiotikumok metabolizmusát.

Summary

Butyrate is a widely used feed additive due to its widespread beneficial effects. It is applied worldwide as an alternative growth promoter in intensive poultry and pig nutrition. Based on its epigenetic effects butyrate can increase the production of certain enzymes at the level of transcription. It is already proved that dietary butyrate supplementation influenced the gene expression of hepatic cytochrome P450 (CYP450), which is one of the most important detoxification enzyme systems of the liver; however, it did not cause any significant changes in the activity of CYP450. Recent studies point to the importance of the CYP450 enzymes in the small intestine as well. The oral administration of butyrate could cause more direct effects on the intestinal mucosal cells than on hepatocytes. Hence we can hypothesize that butyrate may have bigger influence on the enteral CYP450 enzymes.

In our study Ross 308 broiler chickens were fed with corn and wheat based diet, that can influence the endogenous butyrate production; without and with sodium butyrate or protected butyrate supplementation. After slaughtering, intestinal content samples were taken from the duodenum, ileum and caecum, and butyrate concentration of them was determined by gas chromatography. Samples were taken from the mucosa layer of the duodenum as well, and microsomal fractions were isolated by multiple-step differential centrifugation. The mean activity of CYP3A and CYP2C subfamilies, which are the main enzymes of biotransformation in the duodenum, was determined by aminopyrine N-demethylation assay.

The results proved that the protected butyrate supplementation could increase the butyrate concentration in the duodenum and ileum, while in the caecum it was enhanced by the wheat based diet. Regarding the CYP450 enzyme activity in the intestine, our studies showed that in the corn fed groups sodium butyrate had no effect, but protected butyrate supplementation increased the activity of enzymes approximately fivefold compared to the control group. However, sodium butyrate and protected butyrate did not cause any changes as mixed into the wheat based diet, because wheat as carbohydrate source caused higher enzyme activity level without any supplementations.

In conclusion we can state that protected butyrate supplementation causes more increased CYP450 enzyme activity in the duodenum than the sodium butyrate. This is because sodium butyrate is absorbed from the earlier section of the gut, while the protected butyrate passes it. Therefore, butyrate can be presented in the lumen of the duodenum with a relatively high concentration, so it is capable to affect the activity of enteral CYP450

enzymes. As a consequence, it can be suggested that protected butyrate may modify the metabolism of simultaneously applied drugs and xenobiotics.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a tudományos diákköri dolgozatom létrejöttéhez elengedhetetlen közreműködéséért, kitartó lelkesítéséért és fáradhatatlan segítségnyújtásáért témavezetőmnek Kulcsár Annának. Dr. Neogrády Zsuzsanna tanárnőnek, az Élettani és Biokémiai Tanszék Biokémiai Osztály vezetőjének, hálásan köszönöm a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségét, állandó támogatását és a munkánk folyamatos koordinálását.

Köszönöm Prof. Dr. Frenyó V. László tanszékvezető egyetemi tanár úrnak a lehetőséget, hogy bekapcsolódhattam a tanszéki kutatómunkába. Köszönöm az Élettani és Biokémiai Tanszék többi munkatársának is az önzetlen közreműködést. Külön köszönettel tartozom Kulcsárné dr. Petrilla Jankának, Dr. Máti Gábornak és Mackei Máténak a mintavételezések és kísérletek során nyújtott nélkülözhetetlen segítségért, Tolnainé Hinka Mártának és Seprődi Júliának pedig a kísérletek előkészítésében, illetve adminisztrációjában való részvételért.

Ezen kívül további köszönettel tartozom a Pannon Egyetem Georgikon Kar Állattudományi és Állattenyésztési Tanszék munkatársainak. Köszönöm Dr. Dublec Károlynak és Dr. Husvéth Ferencnek, hogy lehetővé tették számunkra a keszthelyi munkát. A butirát-koncentráció gázkromatográfiás méréseiért Dr. Wágner Lászlónak, Dr. Molnár Andornak és Dublec Fanninak, a kísérleti állatok neveléséért és takarmányozásáért pedig Ertsey Csabának, Varga Juditnak és Cseh Lajosnének tartozom köszönettel. A mikroszóma frakciók preparálása során nélkülözhetetlen segítséget kaptunk Prof. Dr. Benkő Máriától az MTA Agrártudományi Kutatóközpont Állatorvos-tudományi Intézetének munkatársától.

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

Irodalomjegyzék

- ÁDÁM, V., FARAGÓ, A., MACHOVICH, R., MANDL, J. (2001): Orvosi biokémia. Budapest: *Medicina Könyvkiadó Rt.*
- ANNUS K. (2010): A nátrium-n-butirát felvételének és metabolizmusának vizsgálata patkány primer májsejtenyészeten. TDK dolgozat. SzIE ÁOTK, Budapest
- ANTONGIOVANNI, M., BUCCIONI, A., PETACCHI, F., LEESON, S., MINIERI, S., MARTINI, A., CECCHI, R. (2007): Butyric acid glycerides in the diet of chickens: effects on gut histology and carcass composition. *Italian Journal Animal Science*, 6. 19-25.
- ATTEH, J. O., ONAGBESAN, O. M., TONA, K., DECUYPERE E., GEUNS J. M., BUYSE J. (2008): Evaluation of supplementary stevia (*Stevia rebaudiana*, bertonii) leaves and stevioside in broiler diets: effects on feed intake, nutrient metabolism, blood parameters and growth performance. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 92. 640-649.
- BERGMAN, F. N. (1990): Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiological Reviews*, 70. 567-590.
- BORDIN, M., D'ATRI, F., GUILLEMOT, L., CITI, S. (2004): Histone deacetylase inhibitors up-regulate the expression of tight junction proteins. *Molecular Cancer Research*, 2. 692-701.
- CANDIDO, E. P. M., REEVES, R., DAVIE, J. R. (1978): Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell Press*, 14. 105-113.
- CSIKÓ, G., NAGY, G., MÁTIS, G., NEOGRÁDY, Z., KULCSÁR, A., JERZSELE, Á., SZEKÉR K., GÁLFI, P., (2014): Effects of dietary sodium butyrate on hepatic biotransformation and pharmacokinetics of erythromycin in chickens. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 37. 406-412.
- FEKETE, S. GY. (2004): Állatorvosi takarmányozástan és dietetika, egyetemi tankönyv. Budapest: *Mezőgazda Kiadó kft.* 678 o.

- FERNÁNDEZ-RUBIO, C., ORDÓÑEZ, C., ABAD- GONZÁLEZ, J., GARCIA- GALLEGO, A., PILAR HONRUBIA, M., JOSE MALLO, J.BALANA-FOUCE, R. (2008): Butyric acid based feed additives help protect broiler chickens from Salmonella enteritidis infection. *Poultry Science*, 88. 943-948.
- FRIEDMAN, A., BAR-SHIRA, E. (2005): Effect of nutrition on development of immune competence in chickens gut associated lymphoid system. *Proc. 15th European Symposium on Poultry Nutrition*. WPSA, Balatonfüred, Hungary. 234-242.
- GÁLFI, P., NEOGRÁDY, S. (2001): The pH-dependent inhibitory action of n-butyrate on gastrointestinal epithelial cell division. *Food Research International*, 34. 581-586.
- GÁLFI, P., BOKORI, J. (1990): Feeding trial in pigs with a diet containing sodium n-butyrate. *Acta Veterinaria Hungaria*, 38. 3-17.
- GARCIA-AGÚNDEZ, J. A., LUENGO, A., BENITEZ, J. (1990): Aminopyrine N-demethylase activity in human liver microsome. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 48. 490-495.
- HU, Z., 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.
- KAGEYAMA, M., NAMIKI, H., FUKUSHIMA, H., ITO, Y., SHIBATA, N., TAKADA, K. (2005): In vivo effects of cyclosporin-A and ketoconazole on the pharmacokinetics of representative substrates for P-glycoprotein and cytochrome P450 (CYP) 3A in rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 28. 316-322.
- KRISTENSEN, N. B., HANSEN, O., CLAUSEN, T. (1995): Measurement of the total concentration of functional Na⁺, K⁺-pumps in rumen epithelium. *Acta Physiologica Scandinavica*, 155. 67-76.
- KULCSÁR, A., MOLNÁR, A., MÁTIS, G., PETRILLA, J., PÁL, L., JERZSELE, Á., NEOGRÁDY, Z., DUBLECZ, K. (2013): A különböző koncentrációkban adott butirát gátló hatásának vizsgálata *Campylobacter jejuni* törzsekre. MTA Állatorvostudományi Bizottság és SZIE ÁOTK DI, akadémiai beszámolója, Budapest

- LE LEU, R. K., BROWN, I. L., HU, Y., MORITA, T., ESTERMAN, A., YOUNG, G. P. (2007): Effect of dietary resistant starch and protein on colonic fermentation and intestinal tumourigenesis in rats, *Carcinogenesis*, 28. 240-245.
- LEESON, S., NAMKUNG, H., ANTONGIOVANNI, M., LEE, E. H. (2005): Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens. *Poultry Science*, 84. 1418-1422.
- MÁTIS, G. (2013): Effects of butyrate on hepatic epigenetics and microsomal drug-metabolizing enzymes in chicken. PhD dolgozat, SzIE ÁOTK, Budapest
- MÁTIS, G., NEOGRÁDY, S., CSIKÓ, G., GÁLFI, P., FÉBEL, H., JEMNITZ, K., VERES, Z., KENÉZ, Á., KULCSÁR, A., HUBER, K. (2013A): Epigenetic effects of dietary butyrate on hepatic histone acetylation and enzymes of biotransformation in chicken. *Acta Veterinaria Hungarica*, 61. 477-490.
- MÁTIS, G., NEOGRÁDY, S., CSIKÓ, G., KULCSÁR, A., KENÉZ, Á., HUBER, K. (2013B): Effects of orally applied butyrate bolus on histone acetylation and cytochrome P450 enzyme activity in the liver of chicken—a randomized controlled trial. *Nutrition and Metabolism*, 10. 12.
- MEDINA, V., EDMONDS, B., YOUNG, G. P., JAMES, R., APPLETON, S., ZALEWSKI, P. D. (1997): Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): Dependence on protein Synthesis and Synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Research*, 57. 3697-3707.
- NASH, T. (1953): The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochemical Journal*, 55. 416-421.
- NYÁRY D. (2013): A takarmánykiegészítőként adott butirát növekedésre és vékonybél-morfológiára gyakorolt hatásainak vizsgálata csirkében és patkányban. TDK dolgozat. SzIE ÁOTK, Budapest
- OBACH, R. S., ZHANG, Q. Y., DUNBAR, D., KAMINSKY, L. S., (2001): Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome P450s. *Drug Metabolism and Disposition*, 29. 347-352.

- OSSELAERE, A., DE BOCK, L., EECKHAUT, V., DE BACKER, P., VAN BOCXLAER, J., BOUSSERY, K., CROUBELS, S. (2013): Hepatic and intestinal CYP3A expression and activity in broilers. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 36. 588-593.
- PHILLIPS, I. (2007): Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 30. 101-107.
- PLEVA, D. (2012): A *per os* felvett butirát máj citokróm P450 enzimek aktivitására gyakorolt hatásának vizsgálata brojlersírkében. TDK dolgozat, SzIE ÁOTK, Budapest
- ROEDIGER, W. E. (1982): Utilization of nutrients by isolated epithelial cells of the rat colon, *Gastroenterology*, 83. 424-429.
- RUSSELL, J. B. (1992): Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. *Journal of Applied Bacteriology*, 73. 363–370.
- VAN IMMERSEEL, F., BOYEN, I., GANTOIS, L., TIMBERMONT, L., BOHEZ, L., PASMANS, F., HAESEBROUCK F., 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. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 427. 123-134.
- WARNECKE, T., GILL, P.T. (2005): Organic acid toxicity, tolerance, and production in *Escherichia coli* biorefining applications. *Microbial Cell Factories*, 4. 25.
- ZHANG, Q. Y., DUNBAR, D., OSTROWSKA, A., ZEISLOFT, S., YANG, J., KAMINSKY, L. S. (1999): Characterization of human small intestinal cytochromes P450s. *Drug Metabolism and Disposition*, 27. 804-809.