

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

Lengyel Péter

**Az inzulin-homeosztázis takarmányozási
faktorokkal történő befolyásolása
csirkében**

Témavezetők: Dr. Mátiš Gábor, Dr. Neogrády Zsuzsanna

Budapest
2014

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	3
Bevezetés és irodalmi áttekintés	5
A csirke szénhidrát-anyagcseréje	5
A glükóz felszívódása és forgalma	5
A csirke szénhidrát-anyagcseréjének endokrin szabályozása	7
Az inkretinek	9
A butirát.....	11
Célkitűzés	13
Anyag és módszer	14
Állatkísérlet	14
Elhelyezés, nevelés	14
A kezelés és vérvétel menete	17
Mérések	18
Inzulin	18
GIP, GLP-1	20
Glükóz.....	21
Statisztika.....	21
Eredmények.....	22
Inzulin	22
GIP	22
GLP-1.....	22
Glükóz.....	22
Megbeszélés	27
Összefoglalás.....	30
Summary	31
Köszönetnyilvánítás	32
Irodalomjegyzék.....	33

Rövidítések jegyzéke

AME_n = nulla nitrogénretencióra korrigált látszólagos metabolizálható energia

ATP = adenzin-trifoszfát

ANOVA = analysis of variance, varianciaanalízis

DNS = dezoxiribonukleinsav

DPP-4 = dipeptidil-peptidáz-4 enzim

EEC = European Economic Community

ELISA = enzyme-linked immunosorbent assay, enzimhez kapcsolt immunoszorbens vizsgálat

FFA = free fatty acid, szabadzsírsav

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

G-protein = guanine nucleotide-binding protein, guaninnukleotid-kötő fehérje

GALT = gut associated lymphoid tissue, nyálkahártya-asszociált nyirokszövet a béltraktusban

GLUT = glucose transporter, glükóz transzporter

GIP = glucose-dependent insulintropic peptide, glükózdependens inzulinotróp peptid; gastric inhibitory polypeptide, gasztrikus inhibitoros peptid

GLP = glucagon-like peptide, glukagon-szerű peptid

GOD/PAP = glükózoxidáz/fenol+aminoantipirin

GOD/POD = glükózoxidáz/peroxidáz

HRP-avidin = horseradish peroxidase-avidin, avidinnel kapcsolt tormaperoxidáz

IGF = insuline-like growth factor, inzulinszerű növekedési faktor

mRNS = messenger ribonukleinsav

MyoD-gén = myogenic differentiation gene, izomdifferenciációt befolyásoló gén

n = egyedszám (mintaelemszám)

n-butirát = normál (egyenes láncú) butirát

NE = nemzetközi egység

NSP = non starch polysaccharide, nem keményítő poliszacharid

p (statisztika) = tévedési valószínűség

pg = pikogramm

pH = az oxóniumionok koncentrációjának negatív, tízes alapú logaritmus

PYY = peptide YY; peptide tyrosine tyrosine

SGLT = sodium-glucose transporter, nátrium-glükóz transzporter

ttkg = testtömeg kilogramm

Bevezetés és irodalmi áttekintés

A csirke szénhidrát-anyagcseréje

Általánosságban kijelenthető, hogy a csirke szénhidrátforgalma és annak endokrin szabályozása, a többi madárfajhoz hasonlóan, nagyban különbözik az emlősökben leírtaktól. A csirke vércukorszintje élettani körülmények között is jóval magasabb, mint a monogasztrikus emlősöké, körülbelül annak a kétszerese; az extrahepatikus szövetek inzulin-érzékenysége viszont elmarad azokétól (Dupont *et al.*, 2004; Hazelwood *et al.*, 1986). A magas vérglükózszintet a madaraknál hagyományosan a repülés nagy energiaigényével hozták kapcsolatba, ennek ellentmond azonban, hogy a vérből, illetve a glikogenolízisből származó vércukor csak a rövid távú repülések energiaigényét fedezi, tartós fizikai megterhelés esetén elsősorban a zsírsavak β -oxidációja, illetve az aminosavak nitrogénmentes szénláncának az elégetése szolgáltatja az energiát (Jenni *et al.*, 1998; Klaassen *et al.*, 2000). A szervezet glükózforgalmának szabályozását számos hormonális tényező biztosítja. Egyik igen jelentős hormon - az élettani körülmények között is magas vércukorszint egyik feltételezett okozója lehet - a glukagon, illetve szintén nagyon fontos hormon az intermedier anyagcserére és a növekedésre gyakorolt összetett hatásai révén az inzulin. Mint anabolikus hatású hormon, az inzulin fokozza a glükóz glikogénbe történő beépítését, a lipogenezist és a fehérjeszintézist (Simon *et al.*, 1989). Így az inzulin szekréciójának és a szöveti inzulinérzékenység befolyásolásának a csirkében termelésélettani jelentősége is lehet.

A glükóz felszívódása és forgalma

A következőkben a glükóz forgalmában részt vevő transzportereket, a glükóz felszívódásának folyamatát és a különféle szövetek glükózfelvételének mechanizmusát, illetve ezek sajátosságait ismertetem csirkékben. A glükóz a szemipermeábilis hártyákon keresztül facilitált diffúzióval, transzmembrán fehérjék (GLUT – glükóz transzporter) segítségével mozog, az emlősökhöz hasonló módon, fontos különbség azonban, hogy az emlősökben nagy jelentőségű, a szív- és vázizomban, illetve a zsírszövetben expresszáldó inzulin- vagy kontrakciófüggő GLUT-4 a madarakban hiányzik (Braun *et al.*, 2008; Dupont *et al.*, 2004), ami ugyancsak összefügghet a madarakban kialakuló magasabb vércukorszinttel. A másik fő transzportertípus, az SGLT (sodium-glucose transporter) madarakban is kiemelt fontosságú, főleg a bélhámsejtek apicalis oldalán kifejeződő SGLT-1 (Braun *et al.*, 2008).

A csirkék esetében, az emlősökhöz hasonlóan, a glükóz felszívódása a béltraktusból két úton mehet végbe, egyrészt a bélhámsejtekben expresszáldó GLUT-2 és SGLT-1 fehérjék segítségével, kisebb hányadban pedig a sejtközi réseken keresztül, paracelluláris diffúzióval is történhet. Az SGLT-1 a bélhámsejtek apicalis oldalán fejeződik ki, ahol – a nátrium elektrokémiai gradiensének megfelelően – két nátriumion mozgását egy molekula glükózzal összekapcsolva juttatja be azt a sejtbe. Ezt a grádienszt a sejtek basolateralis oldalán kifejeződő nátrium-kálium pumpa hozza létre ATP felhasználásával, az ugyanitt elhelyezkedő GLUT-2 transzporterek pedig a portális keringésbe juttatják a glükózt. Az SGLT-1 fehérjét kimutatták már csirke duodenumból, jejunumból, de colorectumból is, utóbbiban vélhetően a vese által vissza nem szívott glükóz megmentése a feladata (Garriga *et al.*, 2009). A bélhámsejtek által felvett glükóz több mint egyharmada átalakul az anaerob glükolízis során tejsavvá, és így lép be a keringésbe (Riesenfeld *et al.*, 1982).

Az emlősökhöz és a többi madárfajhoz hasonlóan a vércukorszint fenntartásának legfontosabb szerve a máj, amely elégtelen takarmányozás mellett is képes a vércukorszintet az élettani szinten tartani a raktározott glikogén bontásával, illetve glükoneogenetikus aktivitásának köszönhetően (Braun *et al.*, 2008; Tinker *et al.*, 1986). Fontos azonban, hogy csirkében és a többi madárban a vesék is igen fontos, vércukorszintet biztosító szervek; a glükoneogenezis közel 30%-a a vesékben zajlik (Tinker *et al.*, 1986). A legfontosabb májban expresszáldó glükóz transzporter a GLUT-2, emellett mRNS szinten kimutatták már a GLUT-1, GLUT-3 és GLUT-8-at is, de ezek szerepe vélhetően elhanyagolható (Carver *et al.*, 2001; Kono *et al.*, 2005).

Az extrahepatikus szövetek közül a vázizomzat fontos szerepet játszik a glükóz homeosztázisában, mint nagy mennyiségű vércukrot felhasználó szerv. Az izomsejtek a glükózt elégethetik, és így energiaforrásként használhatják, a sejtekben a glükóz bekapcsolódhat a glikogenezisbe, illetve felhasználódhat az aminosavak szénláncának szintéziséhez, ezáltal nélkülözhetetlen a fehérjeszintézishez és a gyors izomtömeg-növekedéshez (Braun *et al.*, 2008). A csirkék vázizomzatában felhalmozódó glikogénraktárak bontása éhezés hatására fokozódik (Parker *et al.*, 1976; Tinker *et al.*, 1986).

Fontos különbség az emlősökhöz képest a csirke esetében, hogy az inzulinfüggő GLUT-4 fehérje hiányzik, nem fejeződik ki sem a váz- és szívizomzatban, sem pedig a zsírszövetben. Szerepét vélhetően részben a nemrég felfedezett, szintén inzulin-dependens GLUT-12 fehérje tölti be (Coudert *et al.*, 2013). Mivel a csirkék izomzatában a GLUT-12 mellett GLUT-1 és

GLUT-3 szállítómolekulák is kifejeződnek, melyek inzulinra nem érzékenyek, a vázizomsejtek inzulin nélkül is képesek bizonyos mennyiségű glükóz felvételére (Braun *et al.*, 2008). A csirke szívizomzatának, illetve zsírszövetének glükózfelvételéért GLUT-1 és GLUT-3 fehérjék felelnek, az inzulinfüggő glükóz transzporter (GLUT-4) itt is hiányzik (Kono *et al.*, 2005). A csirke vörösvérsejtek érésük során elvesztik az erythroblastokban még jelentős mértékben kifejeződő GLUT-1-eket, és a GLUT-3 fehérjék mennyisége is csökken, így a keringésben lévő vörösvérsejtek pontos glükózfelvételi mechanizmusa még nem tisztázott (Braun *et al.*, 2008; Johnstone *et al.*, 1998).

Az emlősökhöz hasonlóan a központi idegrendszer csirkében is elsősorban a vérből felvett glükóz aerob oxidációjából fedezi energiaigényének döntő hányadát (Shepherd *et al.*, 1999). Ennek megfelelően a GLUT-1 és a GLUT-3 fehérjék nagy számban találhatók meg az agyban, és biztosítják az idegsejtek folyamatos, inzulinfüggetlen glükózfelvételét (Carver *et al.*, 2001). A legtöbb madárfajhoz hasonlóan a csirke is rendelkezik a rhomboidealis sinusban helyeződő *corpus gelatinosum* nevű szervvel, melynek pontos funkciója máig nem tisztázott (Möller *et al.*, 2003). A *corpus gelatinosum* jelentős mennyiségű glikogént raktároz, melynek szintéziséhez a glükózt GLUT-1 transzporter segítségével veszi fel, így ez a folyamat inzulintól független. Mivel a szerv anatómiai helyeződésénél fogva a vér-agy gátat áttöri, ezért az idegrendszer glükózellátásában, glükózforgalmának szabályozásában lehet jelentős szerepe (Möller *et al.*, 2003).

A csirkék vizelete élettani körülmények között a magas vércukorszint ellenére sem tartalmaz glükózt, köszönhetően annak, hogy a vesék proximális tubulusai az emlősökénél mintegy 4-5-ször nagyobb glükóz-feltevő képességgel rendelkeznek (Morgan *et al.*, 2001). A tubuláris visszaszívásban a GLUT-1, GLUT-2 és GLUT-3 transzporterek szerepét már bizonyították, az SGLT jelenlétét eddig nem vizsgálták (Braun *et al.*, 2008; Kono *et al.*, 2005).

A csirke szénhidrát-anyagcseréjének endokrin szabályozása

A csirke szénhidrát-anyagcseréjében a legfontosabb szabályozó szerv az emlősökhöz hasonlóan az endokrin hasnyálmirigy, mely α -, β -, δ - és F-szigeteket tartalmaz. Az α - és β -szigetek sejtjei termelik a glukagont, illetve az inzulint, a δ -szigetek sejtjei a szomatosztatint, míg az F-szigetek sejtjei felelősek az ún. avian pancreatic polypeptide elválasztásáért (Sitbon *et al.*, 1980). A hasnyálmirigy egészét tekintve kijelenthető, hogy annak állományában a glukagon

koncentrációja jóval magasabb, mint az inzuliné. Csirkében a legtöbb kísérlet arra mutatott rá, hogy az inzulin a vércukorszintet kevésbé befolyásolja, illetve az extrahepatikus szövetek alacsony inzulinérzékenysége miatt a szöveti glükózfelvételre élettani inzulin plazmakoncentráció esetén csak kis mértékben hat (Tokushima *et al.*, 2005). A vérplazma inzulinkoncentrációja csirkékben kb. egytizede az emlősökre jellemző értéknek, ami összefügg azzal, hogy a csirkék hasnyálmirigyében kevés β -sejt található, és ezen sejtekben is viszonylag kicsi az inzulin koncentrációja (Dupont *et al.*, 2004). Bár a glükózzstimulussal szemben meglehetősen ellenálló a madarak hasnyálmirigye, az emlősökben nagy jelentőségű feszültségfüggő káliumcsatornák agonistája, a tolbutamid madarakban is kiváltja az inzulin felszabadulást és a következményes vércukorszint-csökkenést, így vélhetően az inzulinfelszabadulás folyamata madarakban is hasonlóan zajlik, mint az emlősökben (Danby *et al.*, 1982; Tinker *et al.*, 1986). Az inzulinszerű növekedési faktorokkal (IGF-1 és -2) együtt serkenti a növekedést és befolyásolja az állatok takarmányhasznosítását az inzulin (Braun *et al.*, 2008; Gao *et al.*, 2007). Az inzulin a sejtekben sokrétű változásokat okoz különböző intracelluláris kaszkádfolyamatok aktiválásával: ezek modulálásán keresztül serkenti a glikogenezist, glükolízist, lipogenezist és fehérjeszintézist; emelett egyes gének transzkripcióját is szabályozhatja (White *et al.*, 1994). Kimutatták, hogy a napos korban adott inzulin a MyoD gén expressziójára hatva serkentheti a myoblastok proliferációját és csökkentheti differenciálódásukat, ezáltal hozzájárulhat az izomtömeg gyarapodásához, és javíthatja a növekedési mutatókat csirkében (Sato *et al.*, 2012). Más kutatási eredmények szerint a takarmányhoz kevert karbohidráz és fitáz enzimek szignifikánsan növelték az inzulinreceptorok kifejeződését, és ezáltal a takarmányhasznosítást javították brojlercsirkében (Józefiak *et al.*, 2010). Kutatócsoportunk korábban a takarmánykiegészítőként széles körben alkalmazott butirát inzulinjelpályára és a szövetek inzulinérzékenységére kifejtett hatásait vizsgálta brojlercsirkékben, ennek bemutatására a későbbiekben kerül sor.

A glukagon egységnyi tömegre vetítve 8-10-szeres mennyiségben van jelen a csirke hasnyálmirigyében az emlősökéhez képest. A vérglükózsint emelkedésének hatására elválasztása az endokrin szigetekből nagymértékben csökken (Ruffier *et al.*, 1998). Az inzulinnal szemben a csirke nagyon érzékeny a vér glukagonszintjének emelkedésére, és arra a vér glükóz-, triglicerid-, glicerín- és szabadzsírsav-koncentrációjának emelkedésével válaszol. A vércukorszint emelkedését a glukagon az emlősökhöz hasonló módon a máj glikogénraktárainak

bontásával és glükoneogenetikus aktivitásának növelésével éri el (Hazelwood, 1973). Egyes kutatások szerint a mellékvese velőállományából felszabaduló adrenalin csirkében kisebb mértékű hiperglikémiát vált ki, mint az emlősök esetében, így csirkében a glukagon tekinthető az akut stressz fő hormonális mediátorának (Thurston *et al.*, 1993). A δ -sejtek által termelt szomatosztatin parakrin módon mind a glukagon, mind az inzulin elválasztását gátolja, illetve kutatások alapján feltételezhető, hogy a glükóz glukagonfelszabadulást gátló hatása is ezen mediátoron keresztül érvényesül (Honey *et al.*, 1981; Sakurai *et al.*, 1974). Az F-sejtek hormonja, az avian pancreatic polypeptide a zsírbontást serkenti, és emellett az inzulinfelszabadulást gátolja, továbbá elválasztásának hatására a máj glikogénraktárai kiürülnek, amely arra utal, hogy közvetve ugyan, de jelentős mediátor csirkék és más madarak glükóz-anyagcseréjének szabályozásában (Hazelwood, 1973).

A mellékvesekéreg *zona fasciculata* rétegében termelődő glükokortikoidok az emlősökhöz hasonlóan a glükoneogenezis stimulálása révén a vércukorszint lassú, elnyújtott emelkedését okozzák csirkében is. A növekedési hormonnak a gyorsan fejlődő brojlercsirke életében kiemelt jelentősége van, gátolja a glükoneogenezist, segíti az aminosavak fehérjébe való beépülését, de jelentős zsírbontó hatása mellett a vércukorszintet csak kis mértékben emeli (Vasilatos-Younken *et al.*, 1988).

Az inkretin hormonok csirkék szénhidrát-anyagcseréjére kifejtett hatásai az alábbiakban kerülnek tárgyalásra.

Az inkretinek

A szénhidrát-anyagcsere és az inzulin-homeosztázis szabályozásában fontos szerepet töltenek be a bélfal által termelt inkretin hormonok. Az inkretinekhez két enteroendokrin hormon tartozik: az L-sejtek által termelt GLP-1 (glucagon-like peptide 1) és a K-sejtek által elválasztott GIP (gastric inhibitory polypeptide vagy glucose-dependent insulinotropic peptide). Az enteroendokrin sejttípusok megoszlása bélszakasz specifikus, a K sejtek csak a vékonybélben fejeződnek ki, javarészt az epésbélben és az éhbélben, de kismértékben a csípőbélben is (Kim and Egan, 2008). Az L-sejtek egyaránt kifejeződnek a vékonybélben és a remesebélben (Doyle and Egan, 2007), ezek közül a disztális bélcsatorna L-sejtjei a PYY (peptide YY) elválasztásáért is felelnek. Az L-sejtek által termelt GLP-1-et a *proglucagon* gén kódolja, hasonlóan a glukagonhoz és a GLP-2-höz; a fehérje csak később, a poszttranszlációs modifikáció során nyeri majd el

végleges, aktív formáját (Kim and Egan, 2008). A szintén itt termelődő GLP-2 nem rendelkezik az inkretin hormonokhoz hasonló biológiai funkcióval, nincs inzulinfelszabadulást serkentő és vérglükózsint csökkentő hatása (Kim and Egan, 2008). Annak ellenére, hogy egyazon génen kódolódik a glukagon, a GLP-1 és a GLP-2, gyakorlatilag nem kötődnek egymás receptoraihoz, azok erőteljes specifikációja miatt (Kim and Egan, 2008).

Az inkretinek az étkezés (ill. állatokban a takarmányfogyasztás) során szabadulnak fel a sejtekből, és a glükóz-indukált inzulin-szekrécióban van szerepük (Holst *et al.*, 2008). A takarmányfogyasztást követő inzulinfelszabadulás körülbelül 70%-áért felelősek az inkretinek (Holst *et al.*, 2008). Mind a GIP, mind a GLP-1 emlősökben a hasnyálmirigy szigeteinek β -sejtjein kifejeződő, saját receptorán hat, ezáltal indukálja a β -sejtek proliferációját, azok apoptózisát gátolja, és segíti a glükóz-dependens inzulinfelszabadulást (Baggio *et al.*, 2007). Nemrég leírták, hogy csirkében a GLP-1 receptorok nem a β -sejteken expresszálódnak, hanem a hasnyálmirigy szigeteinek szomatostatint termelő δ -sejtjein fejeződnek ki (Watanabe *et al.*, 2014). Ez alapján feltételezhető, hogy a GLP-1 emlősökhöz igen hasonló mértékű, inzulinfelszabadulást serkentő hatása csirkében más receptorális úton keresztül valósul meg.

Az inkretinek nem csak a hasnyálmirigy endokrin szigeteinek működését modulálják, hanem egyéb szövetekre is van hatásuk. Így a GIP fokozza a zsírraktározást a zsírszövetben, és serkenti a csontképződést az osteoblast sejtek proliferációjának elősegítésével, míg a GLP-1 ismert hatásai közé tartozik a gyomorkiürülés lassítása, a gyomor fedősejtek sósavszekréciójának csökkentése, a jóllakottság érzetének kialakítása és a glükóz glukagonfelszabadulást gátló tevékenységének elősegítése (Baggio *et al.*, 2007). A legtöbb sejt felületén expresszálódó, oda kötött, dipeptidil-peptidáz-4 enzim (DPP4) felelős az inkretin hormonok gyors inaktiválásáért. Mivel ismert, hogy a madarak szénhidrát-anyagcseréje és glükóz-homeosztázisa sok ponton eltér az emlősökétől, az inkretin-háztartás vizsgálata és annak befolyásolása takarmányozási faktorokkal nagy jelentőséggel bírhat.

A butirát

Az n-butirát (továbbiakban: butirát) a négy szénatomot tartalmazó vajsavnak az anionja. Nagy mennyiségben keletkezik a baktériumok anaerob fermentációja során a kérődzők előgyomraiban, illetve a monogasztrikus állatok vastagbelében. A colonocyták fő energiaforrásként szolgál (Velázquez et al., 1997), a sejtekbe jutva aktiválódás után a β -oxidációba képes belépni. Ismert a butirát szelektív antimikrobiális hatása, melynek során az emelkedő butirátkoncentrációra érzékenyen reagálnak egyes patogén baktériumfajok, így az enterotoxikus *Escherichia coli* törzsek, illetve *Salmonella* és *Clostridium* fajok, miközben az eubiotikus flóra nem károsodik (Ricke, 2003; van Immerseel et al., 2005; Fernández-Rubio et al., 2008). A butirát szükséges továbbá a GALT (gut associated lymphoid tissue) megfelelő fejlődéséhez (Friedman et al., 2005), emellett gyulladáscsökkentő hatását is kimutatták már (Segain et al., 2000). Ezen hatások okán a butirátot széles körben felhasználják takarmánykiegészítőként a nagyüzemi állattartásban. A bélhámsejtek által le nem bontott butirát a portális keringéssel a májba juthat, és ott a hepatocyták β -oxidációjába, illetve a ketogenezisbe kapcsolódhat be. A butirát májsejtek által nem metabolizált hányada epigenetikus hatást fejthet ki: a hisztonfehérjék acetilációjának mértékét és a DNS metiláltságát módosítva megváltoztathatja a kromatinállomány szerkezetét, és ezáltal egyes gének expresszióját (Doyle, 2010). A butirát, mint jelátvivő hatású molekula, kötődhet továbbá a G-protein kapcsolt FFA receptorokhoz is, elsősorban az FFA3-hoz (free fatty acid receptor 3), mely többek között a bélben is kifejeződik az enteroendokrin sejtek közelében, és így azok hormontermelésére hathat (Lin et al., 2012).

A bélcsatornában keletkező butirátnak csak kis hányada jut el a szisztémás keringésig (Guilloteau et al., 2010). Egérben megfigyelték, hogy a takarmánykiegészítőként adott, nagy mennyiségű butirát a máj metabolizációs kapacitását telítve bejuthat a szisztémás keringésbe, és növelheti a sejtek inzulin iránti érzékenységet, ezzel megváltoztatva a vérplazma glükóz- és szabadzsírsav-koncentrációját (Gao et al., 2009). Ezzel szemben csirkében a bolusban adott butirát csökkentette a szisztémás inzulinérzékenységet (Mátis et al., 2014). A butirátkezelés hatására a csirke máj- és zsírszövetében az inzulin receptorok down-regulációja következik be, míg a vázizomsejtekben kifejeződésük mértéke nő, a vérplazmában pedig mind a glükóz, mind az inzulin koncentrációja emelkedik (Mátis et al., 2014). A butirátadagolás által kiváltott receptorexpresszió-változásnak és a vérplazma inzulinszint növekedésének termelésélettani

jelentősége lehet, mivel így az inzulin stimulálhatja a vázizmok glükózfelvételét, és képes lehet a fehérjeszintézis serkentésével az izomtömeg nagyobb arányú növelésére. Az egérben leírtakhoz képest csirkében tapasztalt jelentős eltérések feltehetően a madarak és az emlősök szénhidrát-háztartásának nagyfokú különbözőségéből fakadnak.

A butirát inzulin-homeosztázisra gyakorolt hatását emellett a butirát eredete, illetve felszívódásának helye is alapvetően befolyásolhatja. Munkacsoportunk további vizsgálatok során kimutatta, hogy a takarmány nem keményítő típusú poliszacharid-tartalmának emelése – amely stimulálja a caecumban zajló endogén bakteriális butiráttermelést – csökkentette a vérplazma inzulinkoncentrációját, azaz a vakbélből felszívódó butirát a szájon át adott butiráttal ellentétes hatást fejtett ki (nem publikált adatok). Az inkretintermelő enteroendokrin sejtek bélszakasz-specifikus megoszlása felveti annak lehetőségét, hogy a szájon át adott és vastagbél eredetű butirát eltérő hatása az inkretinek szabályozó szerepével áll összefüggésben. Butirátkezelés hatására egérben szignifikánsan emelkedett a GIP és GLP-1, és ezekhez kapcsolatosan az inzulin plazmakoncentrációja is (Lin *et al.*, 2012). Mivel az inkretin-elválasztás takarmányozási faktorokkal történő befolyásolására vonatkozóan madarakban csak nagyon kevés irodalmi adat áll rendelkezésünkre, és az inkretinek pontos szabályozó szerepe is kevésbé tisztázott, munkánk során arra kerestük a választ, hogyan befolyásolja a szájon át adott butirát az egyes inkretinek, és ezzel összefüggésben az inzulin homeosztázisát.

Célkitűzés

Kísérletünk során az inkretinek inzulin-homeosztázisban betöltött szerepét, illetve ennek takarmányozási faktorokkal történő befolyásolását kívántuk vizsgálni csirkében. Ezen kutatási terület emlősökben már nagyrészt feltárt; ismert, hogy az inkretinek a takarmányfelvételt követő inzulinfelszabadulás fontos irányítói. Ezzel szemben az inkretinek szerepe, jelentősége madarakban kevésbé ismert, így ezen fajokban történő vizsgálatuk összehasonlító élettani szempontból is nagy jelentőséggel bír. A csirkében és más madárfajokban tapasztalható, emlősökkel szembeni jelentős szénhidrát-háztartásbeli különbségek miatt felmerül a kérdés, hogy az emlősökben kulcsfontosságú inkretinek madarakban milyen mértékben és milyen módon modulálják az inzulin felszabadulását.

Szintén célul tűztük ki az élettani szabályozás megismerése mellett azt is, hogy megvizsgáljuk az inzulin felszabadulásának befolyásolási lehetőségét takarmányozási faktorok segítségével. Így munkánk során az alternatív hozamfokozóként, takarmánykiegészítőként is széles körben alkalmazott, epigenetikusan aktív és receptorális hatásokkal is rendelkező butirát inkretin-elválasztásra gyakorolt hatását kívántuk vizsgálni. Ismert, hogy a madarak szöveteinek élettanilag alacsony az inzulinérzékenysége, így amennyiben ezt valamely takarmányozási faktor, takarmánykiegészítő befolyásolni, növelni képes, úgy ettől a termelékenység javulása is várható.

Kérdéseink megválaszolása érdekében 24 napos, az intenzív növekedés fázisában lévő brojlercsirkéket begyszondán keresztül kívántunk kezelni különböző töménységű butirátoldatokkal, azok akut hatását vizsgálva. A két alkalmazott dózis közül az alacsonyabb (0,25 g/ttkg) felel meg a nagyüzemi baromfitartásban alkalmazott takarmánykiegészítéssel naponta felvett butirát mennyiségének. Az emelt dózis (1,25 g/ttkg) viszont egy jelentősen megnövelt butirátmennyiség beadását jelenti, mellyel a butirát további, magasabb koncentráció esetén fellépő esetleges hatásait kívántuk vizsgálni. Az állatoktól a kezelés előtt egyszer, majd azt követően háromszor kívántunk vért venni (0., 10., 30., 60. perc), és a vérplazma inzulin-, GIP-, GLP-1- és glükózkoncentrációjának alakulását nyomon követve vizsgálni az inzulin-homeosztázis butirát hatására bekövetkező változásait.

Anyag és módszer

Állatkísérlet

Elhelyezés, nevelés

A munkacsoportunk által végzett állatkísérletek során a hatályos hazai és európai uniós jogszabályokat (86/609/EEC) betartottuk, a kísérletek elvégzése a Munkahelyi Állatjóléti Bizottság engedélyével zajlott.

Kísérleteinkhez 24 napos, ivar alapján elkülönített, kizárólag hímivarú brojlercsirkéket használtunk fel. A Ross 308 törzsbe tartozó állatokat napos korban vásároltuk a Gallus Kft. devecseri keltetőjéből, és ezeket Karunk Élettani és Biokémiai Tanszékének állatházában helyeztük el. A tartási körülmények minden tekintetben megfeleltek a Ross technológia előírásainak (Ross Broiler Management Manual, 2009). A hímivarú állatokat hét fős csoportokba osztottuk, és 1,5 m² alapterületű fémketrecekben, friss faforgács almon tartottuk. Az alkalmazott fényprogram az állatok igényeit kielégítette; a betelepítéstől a 7. napig napi 23 óra, a 8.-tól a 14. napig napi 18 óra, ezt követően a kísérlet befejeztéig napi 16 óra megvilágítást biztosítottunk. A hőmérséklet beállítása is megfelelt a fejlődő állatok szükségleteinek: az első napokban megszabott 30-33°C-ról fokozatosan 25-26°C-ra csökkentettük. A relatív páratartalom a nevelés teljes ideje alatt 35-45% között mozgott, a csibék igényeinek megfelelően. A csirkéket a kísérlet megkezdéséig (24. nap) *ad libitum* láttuk el vízzel és takarmánnyal (**1. táblázat**). A kísérlet megkezdése előtt 12 órával a takarmányt megvontuk az állatoktól, hogy elősegítsük a beadandó butirát bolus minél eredményesebb felszívódását.

Az állatok fejlődésének nyomon követése érdekében a csirkék testsúlyát és takarmányfelvételét folyamatosan mértük, és meghatároztuk a legfontosabb termelési paramétereket (**2. táblázat**). Ez alapján megállapítható, hogy az állatok a Ross technológia követelményeinek megfelelően fejlődtek, és az egyes csoportok között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.

1. táblázat. A brojlersírkék takarmányának összetétele és beltartalmi paraméterei
(számított értékek)

Összetevők, g/kg	
Kukorica	593,7
Szója	310,0
Kukoricaglutén	50,0
Takarmánymész	15,0
Kalcium-foszfát	18,5
NaCl	4,0
Vitamin-ásványi anyag keverék ¹	6,0
L-lizin-HCl	1,8
DL-metionin	1,0
Beltartalmi paraméterek	
Nyersfehérje g/kg	212,2
Nyerszsír g/kg	29,4
Nyersrost g/kg	25,3
Nyershamu g/kg	65,9
AME _n , MJ/kg	11,9
Lizin, g/kg	11,9
Metionin g/kg	4,9
Metionin + Cisztein, g/kg	8,6
Kalcium, g/kg	11,6
Foszfát, elérhető, g/kg	4,5
Salinomycin-Na mg/kg	66,0

¹Ásványianyag- és vitamintartalom (takarmány-kg-ra számolva): Se: 0,24 mg; Fe: 135mg; Mn: 136 mg; Cu: 22 mg; Zn: 110 mg; I: 1,2 mg; retinil-acetát: 4,14 mg; kolekalciferol: 0,075 mg; tokoferol: 26,85 mg; kolinklorid: 360 mg; menadion: 3,0 mg; riboflavin: 7,0 mg; kobalamin: 0,03 mg; niacin: 40 mg; pantoténsav: 12 mg; folsav: 1,0 mg; piridoxin: 5,0 mg.

2. táblázat. A testtömeg és takarmányfelvétel változásai a brojlercsirkékben

	Kontroll	Butirát alap	Butirát emelt
Testtömeg (g)			
0. nap	43,4 ± 0,4	44,1 ± 0,8	43,6 ± 0,7
7. nap	227,2 ± 6,9	212,6 ± 6,3	221,8 ± 2,5
14. nap	471,7 ± 6,4	475,0 ± 14,0	494,3 ± 7,7
21. nap	935,0 ± 11,4	913,9 ± 28,7	894,8 ± 17,1
24. nap	1072,4 ± 14,3	1106,0 ± 15,3	1075,2 ± 16,5
Takarmányfelvételi átlagok (g/csirke, naponta)			
0-6 nap	27,8	29,3	28,5
7-13 nap	60,5	61,5	62,0
14-20 nap	87,7	86,6	85,9
21-24 nap	99,0	99,9	99,2

A testtömegeket egyedenként megmértük a 0., 7., 14., 21. és 24. napokon, és ezek értékeit a csoport átlagában ± standard hiba adtuk meg (n=7/csoport). A naponta elfogyott takarmány mennyiségéből számoltuk ki a csoportonkénti átlagos napi takarmányfelvételt.

Butirát alap = Szájon át történő butirát bolusos kezelés a 24. napon (0,25 g/ttkg).

Butirát emelt = Szájon át történő butirát bolusos kezelés a 24. napon (1,25 g/ttkg).

Kontroll = Szájon át történő kezelés fiziológiás sóoldattal a 24. napon.

A kezelés és vérvétel menete

Az állatkísérletbe 21 állatot vontunk be, melyeket 3 csoportra osztottunk a kezelés típusa szerint. A kezelések a 24. napon történtek, 12 órás takarmánymegvonást követően. A 12 órás takarmánymegvonásra azért volt szükség, hogy az állatok bélcsatornája kiürüljön, és a később bolusban beadott nátrium-butirát (Sigma-Aldrich, München, Németország) az üres bélcsatornából minél hamarabb fel tudjon szívódni. A kezelést minden állat esetben egy vérvétel előzte meg (1. vérvétel, 0. perc). A mintavételt a szárnyvénából végeztük el.

A kontroll csoport tagjait begyszondán keresztül beadott fiziológiás sóoldattal kezeltük, 2,5 ml/ttkg dózisban. A „butirát alap” csoport tagjai begyszondán keresztül 0,1 g/ml koncentrációjú, míg a „butirát emelt” csoport tagjai 0,5 g/ml koncentrációjú nátrium-butirát oldatos kezelést kaptak, 2,5 ml/ttkg dózisban, begyszondán keresztül. Az állatoknak beadott butirátmennyiség így 0,25 g/ttkg-nak felelt meg a „butirát alap” csoport, míg 1,25 g/ttkg-nak a „butirát emelt” csoport esetében.

A „butirát alap” csoport tagjainak adott bolus felel meg a nagyüzemi körülmények között, takarmánykiegészítőként alkalmazott, egy állat által a takarmánnyal felvett átlagos napi butirátmennyiségnek. A „butirát emelt” csoport által kapott butirátmennyiség ezzel szemben egy jelentősen megnövelt adag, mellyel a butirát további, nagyobb dózis alkalmazása esetén várható lehetséges hatásait kívántuk vizsgálni.

A butirát *in vivo* hatásainak alapkutatói jellegű vizsgálatára többféle beadási módot alkalmazhatunk (Mátis, 2013; Lin *et al.*, 2012). Az egyik lehetőség a nátrium-butirát takarmánymegvonást követő, bolusban történő, egyszeri beadása, amelyet mi is alkalmaztunk. A másik vizsgálati modell a butirát takarmányba keverése, melynek során az állatok a butirátot folyamatosan, egész nap a takarmánnyal együtt veszik fel. A bolusban történő kezelés egy széles körben elfogadott vizsgálati módszer, *in vivo* modell, amelyet tanszékünk kutatócsoportja már korábban is alkalmazott (Mátis *et al.*, 2013). Ennek során egy olyan vizsgálati rendszert alakítunk ki, melynek előnye a takarmánykiegészítőként történő adagolással szemben, hogy ilyenkor a beadást követően az üres gyomor-bélcsatorna proximális szakaszáról rövid időn belül felszívódik a butirát szinte teljes mennyisége. Ez elsősorban annak köszönhető, hogy az „üres” gyomor-bél traktus elülső szakaszaira (begy, gyomor) jellemző alacsony pH-n a disszociálatlan vajsav könnyen diffundál át a szemipermeábilis hártyákon keresztül. A gyorsan felszívódó butirát jelentősen megemeli a portális és a szisztémás vér butirátkoncentrációját, így egyszeri, akut

stimulust jelent mind a máj, mind az extrahepatikus szövetek számára, ezzel jó lehetőséget teremtve a butirát lehetséges biokémiai hatásainak molekuláris szintű vizsgálatára is (Mátis *et al.*, 2013).

A butirát takarmányba keverése esetén az állatok a butiráthoz folyamatosan kis mennyiségben jutnak hozzá, mely a bélcsatornába jutva elnyújtottan szívódik fel, a takarmány emésztésének megfelelően. Ebben az esetben a vérben folyamatos, de mérsékelt butirátkoncentráció-emelkedés tapasztalható. Előnye a takarmányba kevert butirát alkalmazásának a bolusban történő kezeléssel szemben, hogy az így kapott kutatási eredmények vélhetően jobban extrapolálhatóak az intenzív állattartás során fellépő hatásokra, hiszen a nagyüzemi körülményekhez hasonló módon jutnak a butiráthoz az állatok. A boluskezelést viszont a magasabb, jobban detektálható vérszintek és a biológiai hatások erőteljesebb megjelenése teszi előnyössé a további lehetséges biológiai hatások felkutatására.

Az állatoktól a bolus beadását követően vért vettünk a kezeléstől számított 10., 30. és 60. percben heparinos csövekbe. A kezelt állatok a vérvételezések befejezéséig nem jutottak takarmányhoz. A véralvadás megakadályozása érdekében a heparinos vérvételi csöveket a vérvétel után egyszer átforgattuk. Az alvadásában gátolt vérmintákat előbb jégre téve hűtöttük, majd azokat centrifugáltuk (15 perc, 1000g), a mintákból a plazmát leszívtuk, és a későbbi felhasználásig -80°C-os hőmérsékletet biztosító fagyasztógépben tároltuk.

Mérések

Munkacsoportunkkal a csirkékből nyert vérplazmamintákból három hormon, valamint a glükóz mennyiségi meghatározását végeztük el. Az inzulin, a GIP (gastric inhibitory polypeptide vagy glucose-dependent insulinotropic polypeptide) és a GLP-1 (glucagon-like peptide-1) koncentrációjának ELISA módszerrel történő mérése, illetve a vérplazma glükózkoncentrációjának spektrofotometriás diagnosztikai teszttel való meghatározása a következőkben kerül ismertetésre. A mérések megkezdése előtt a fagyasztott plazmamintákat jégre téve olvasztottuk fel.

Inzulin

A minták inzulin-koncentrációjának meghatározását kompetitív, enzim inhibíciós, csirke specifikus szendvics ELISA-val végeztük el a gyártó utasításai szerint (MyBioSource, San

Diego, California, USA, cikkszám: MBS701713). Az alábbiakban az alkalmazott protokollt foglalom össze röviden.

Elsőként előkészítettük a 96 lyukú mikrotiter lemezt, az első sorban két lyukat üresen hagytunk „Vak”-nak, a maradék tíz vájatba kerültek a standard sor oldatai, összesen ötféle, mindegyikből két-két lyukba mértünk 50 μ l-t. A mintáinkat a felolvasztás után, hígítás nélkül, vortexelést követően bemértük a lyukakba (50 μ l/lyuk).

A mérésünkhöz használt mikrotiter lemez úgy került kialakításra, hogy lyukait előzőleg inzulin-specifikus antitestekkel vonták be, mely a minta inzulinmolekuláit képes megkötni. A minták bemérését követően a „konjugátum” oldatok adagolása következett többcsatornás pipettákkal, a két „Vak” lyuk kivételével minden helyre mértünk 50 μ l mennyiséget. (A „Vak” végig üresen maradt.) A „konjugátum” tartalmazta a biotinnal kapcsolt inzulint, mely a rendszerbe kerülve a minta saját inzulinmolekuláival versengésbe kezdett a lyukak inzulin-kötőhelyeinek az elfoglalásáért. Minél több biotinnal konjugált inzulin tudott ezekhez a kötőhelyekhez kötődni, annál kevesebb szabad inzulin volt eredetileg a mintánkban. A „konjugátum” bemérése után 60 percen keresztül 37°C-os termosztátban inkubáltuk az ELISA-lemezt. Az inkubációs idő letelte után a folyadékot a lyukakból többcsatornás pipetta segítségével eltávolítottuk, majd azokat mosópufferrel háromszor átmostuk. (Az átmosással minden esetben a rendszerben feleslegben lévő, nem kötött molekuláktól kívántunk megszabadulni.) Ezután minden lyukba 50-50 μ l HRP-avidin (horse radish peroxidase-avidin = avidinhez kapcsolt tormaperoxidáz) tartalmú oldatot mértünk be. Az avidin a biotinhoz erősen kötődik, így a lemezen megkötött biotinilált inzulinnal arányos mennyiségű HRP-avidin kötődik az előbb kialakult biotinilált inzulin – anti-inzulin ellenanyag komplexekhez. A HRP-avidin adagolása után 30 percig inkubáltuk a mikrotiter lemezt a 37°C-os termosztátban. Ezt követően a folyadékokat a lyukakból ismét leszívtuk, majd háromszori mosás után hidrogén-peroxid-oldatot, majd színeképző szubsztrátot tartalmazó oldatot mértünk a lyukakba 50-50 μ l mennyiségben. Ezt a lépést egy 15 perces inkubáció követte a 37°C-os termosztátban, majd a kénsavtartalmú „Stop oldat” hozzáadásával a további színváltozást leállítottuk. (A peroxidáz aktivitásnak köszönhetően a hidrogén-peroxid bontása közben a színeképző anyag oxidálódott, és ezáltal színes vegyületté alakult.) A keletkezett szín intenzitását 450 nm-en mértük a vak ellenében. Az eredmények feldolgozása során a standard sor adataira a Curve Expert 1.3 program segítségével illesztettünk görbét, majd a kapott egyenlet alapján meghatároztuk az egyes minták inzulinkoncentrációját.

GIP, GLP-1

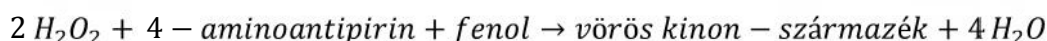
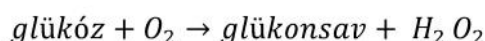
A GIP és a GLP-1 vérplazmából történő meghatározásának módszere rendkívül hasonló, így az alábbiakban együtt kerül tárgyalásra. Mindkét esetben a mennyiségi meghatározást dupla antitestes, csirke specifikus szendvics ELISA módszerrel végeztük el a gyártó utasításai szerint (MyBioSource, San Diego, California, USA, cikkszámok: MBS261884, MBS260694).

A minták felolvasztása után először – a GIP és a GLP-1 esetében egyaránt – a standard sor elkészítésére került sor, ennek során a gyártó által biztosított liofilizált standardet 1 ml standard diluens segítségével rekonstituáltuk, 30 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, összeráztuk, és ebből kiindulva elkészítettük az összesen nyolc tagú hígítási sort. A hígítás előtt 300-300 µl standard diluens pipettáztunk a 7 Eppendorf csőbe, majd sorban, a tömény standardtól kezdve, 300 µl-t pipettáztunk át az előző Eppendorf csövekből a soron következőkbe. Ezután a 96 lyukú mikrotiter lemezre vittük fel a standard sor tagjait, illetve a mintákat (100 µl/lyuk). Ezt követően mindkét ELISA kit esetében 90 percig inkubáltuk a lemezeket 37°C-os termosztátban. Az inkubáció során a mintáinkban levő GIP és GLP-1 molekulák kapcsolódtak a mikrotiter lemez lyukainak falához kötött, specifikus monoklonális ellenanyagokkal. Az inkubációs idő alatt elkészítettük a mosópuffert, valamint megtörtént a biotinnal jelölt GIP, ill. a biotinnal jelölt GLP-1 antitestek 100-szorosára történő hígítása. Az inkubációs idő letelte után, többcsatornás pipettákkal leszívtuk a lyukakból a folyadékot, és a mosópuffer oldattal háromszor átmostuk az összes lyukat. Ezután a lyukakba bemértünk 100-100 µl biotinilált GIP antitestet a GIP kit esetében, és szintén 100-100 µl biotinilált GLP-1 antitestet a GLP-1 kit esetében, majd egyórás inkubáció következett 37°C-os termosztátban. Ezalatt a biotinnal jelölt antitestek kapcsolódtak a lyukak belső felületén az előbbieknél létrejött antigén-ellenanyag komplexekhez, a minta hormontartalmával arányos mennyiségben. A várakozás idő letelte után a lyukak ismételt háromszori átmosása következett. A mosás után 100-100 µl hígított „enzim-konjugátum” oldatot (avidinnel kapcsolt tormaperoxidáz tartalmú oldat) mértünk többcsatornás pipettával a lyukakba. Ezután a lemezeket 30 percig inkubáltuk a 37°C-os termosztátban. Az inkubáció leteltét követően, háromszori mosás után a színeképző oldatból mértünk be 100-100 µl mennyiséget, majd ismét 30 percig inkubáltuk sötétben a lemezeket. A színeképzés ugyanazon elv szerint történt meg itt is, mint az inzulin ELISA esetében, azaz a tormaperoxidáz enzim a hidrogén-peroxid elbontása közben a színeképző szubsztátot színes terméké oxidálta.

Ezen ELISA módszer alkalmazása során a keletkezett szín intenzitása annál nagyobb, minél több a vizsgált molekula a mintánkban. A színeképzést kénsavtartalmú oldattal állítottuk le az inkubációs idő letelte után. A keletkezett szín intenzitását 450 nm-en mértük, végül az abszorbancia-értékekből – az inzulin esetében már ismertetett módon – meghatároztuk az egyes minták hormonkoncentrációját.

Glükóz

A vérplazma-minták glükózkoncentrációját a GOD-POD módszerre épülő glükóz GOD/PAP spektrofotometriás diagnosztikai reagenskészlet (Diagnosticum Zrt., Budapest) segítségével határoztuk meg. Ennek működési elve a következő: a glükózoxidáz (GOD) a mintában található glükózt glükonsavvá oxidálja. A keletkező H_2O_2 -t a peroxidáz (POD) bontja, miközben a színreagensben található színeképző szubsztát (4-aminoantipirín) oxidálódik és fenollal vörös színű, fotometriásan mérhető kinonimin-származékot képez.



A mérést – az ELISA vizsgálatokhoz hasonlóan – 96 lyukú mikrotiter lemezen végeztük, az egyes lyukakba 3 μ l vérplazmát, illetve standard glükózoldatot mértünk be. Ezt követően minden vájatba 300 μ l színreagenst pipettáztunk, és az elegyeket 37°C-on 5 percig inkubáltuk, majd 546 nm-es hullámhosszon mértük az abszorbancia-értékeket. Az egyes minták glükózkoncentrációját a standard glükózoldat abszorbanciája alapján határoztuk meg.

Statisztika

Az eredmények kiértékeléséhez az R program 2.11.1-es verzióját használtuk, az eredményeket átlag $\pm$ standard hiba formában adtuk meg. Az adatok eloszlását hisztogram segítségével vizsgáltuk, majd egyutas ANOVA-val értékeltük őket. A kontroll csoporttól való eltérést szignifikánsnak tekintettük, ha a p érték kisebb volt, mint 0,05.

Eredmények

Inzulin

Az inzulin ELISA tesztek eredményeinek statisztikai kiértékelése során megállapítottuk, hogy a vérplazma inzulinkoncentrációja már a 10. perctől kezdődően szignifikáns csökkenést mutatott a 0. perchez viszonyítva mind a „butirát alap”, mind a „butirát emelt” csoport esetében. A „butirát alap” csoport esetében a 10. és 30 percben ($p < 0,01$), valamint a 60. percben is ($p < 0,05$) szignifikáns csökkenés volt tapasztalható a 0. perchez képest. A „butirát emelt” csoportnál is szignifikáns csökkenést észleltünk a 10. ($p < 0,05$), 30. ($p < 0,01$) és 60. ($p < 0,05$) percben a 0. perchez viszonyítva. A kontrollcsoport esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást az inzulin plazmakoncentrációjában. A vérplazma inzulinkoncentrációjának értékeit az **1. ábra** mutatja be az egyes csoportok esetében.

GIP

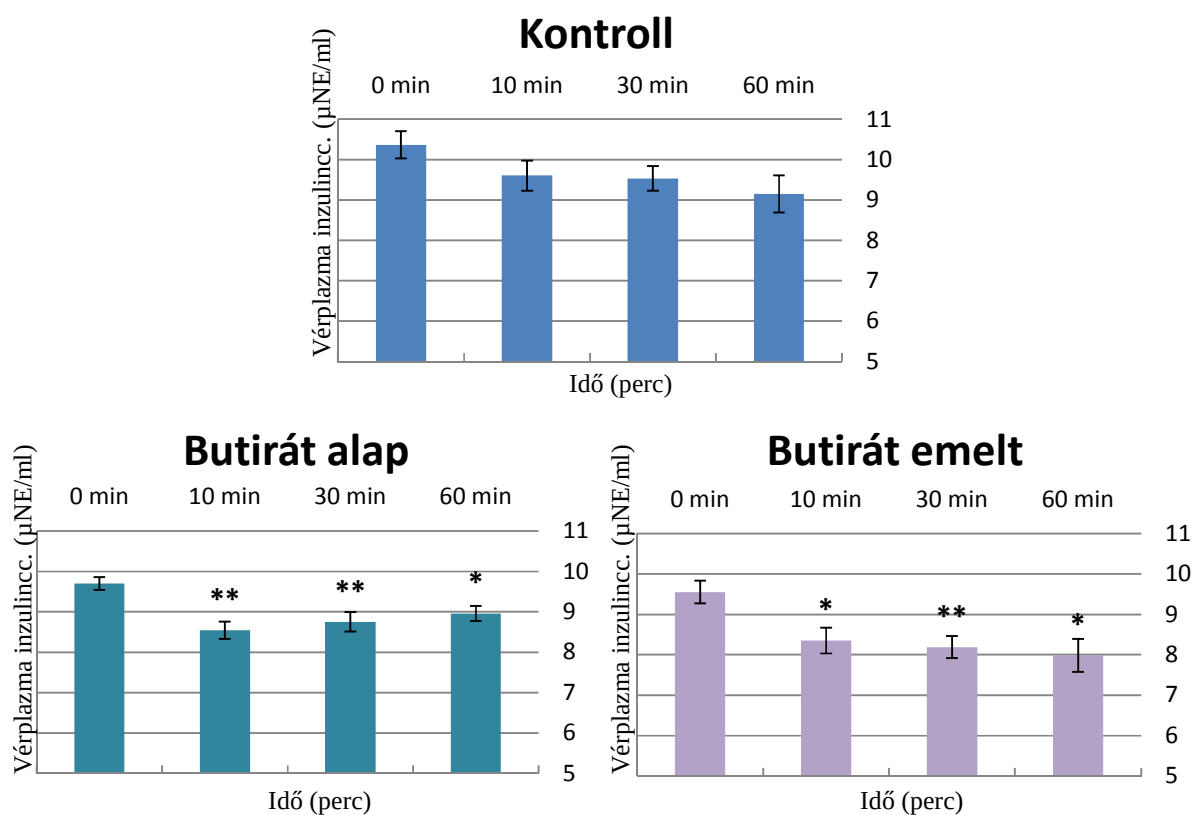
A GIP ELISA tesztek eredményei alapján megállapítható, hogy csak az emelt dózisú butirátkezelés („butirát emelt” csoport) csökkenti szignifikánsan a vérplazma GIP koncentrációját. A „butirát emelt” csoport esetében szignifikáns csökkenés volt tapasztalható a GIP vérplazma-koncentrációjában a 30. és 60. percben ($p < 0,05$) a 0. perchez viszonyítva. A kontroll és a „butirát alap” csoport esetében nem tapasztaltunk szignifikáns változást a vérplazma-koncentrációkban. A vérplazma GIP-koncentrációjának értékeit a **2. ábra** mutatja be az egyes csoportok esetében.

GLP-1

A mérési eredmények alapján megállapítottuk, hogy sem az alap, sem az emelt dózisú butirát nem befolyásolta szignifikánsan a GLP-1 vérplazma-koncentrációját, a kontrollcsoport esetében sem tapasztaltunk szignifikáns változást a vérplazma-koncentrációkban. A vérplazma GLP-1-koncentrációjának értékeit a **3. ábra** mutatja be az egyes csoportok esetében.

Glükóz

Eredményeink szerint sem az alap, sem az emelt dózisú butirát nem befolyásolta szignifikáns mértékben a vérplazma glükózkoncentrációját, és a kontrollcsoport esetében sem tapasztaltunk szignifikáns változást a vérplazma-koncentrációkban. A vérplazma glükózkoncentrációjának értékeit a **4. ábra** mutatja be az egyes csoportok esetében.



1. ábra. A vérplazma inzulinkoncentrációjának változása butirátkezelés hatására

A három csoportot az alábbiakban szereplő oldatokkal kezeltük begyszondán keresztül a nulladik perces vérvételt (1. vérvétel, 0 min) követően. A vérvételezést megismételtük a 10., 30. és 60. percben. Az oldatok koncentrációja és dózisa:

Kontroll: fiziológiás sóoldat, 2,5 ml/ttkg

Butirát alap: nátrium-butirát oldat, 0,1 g/ml, 2,5 ml/ttkg

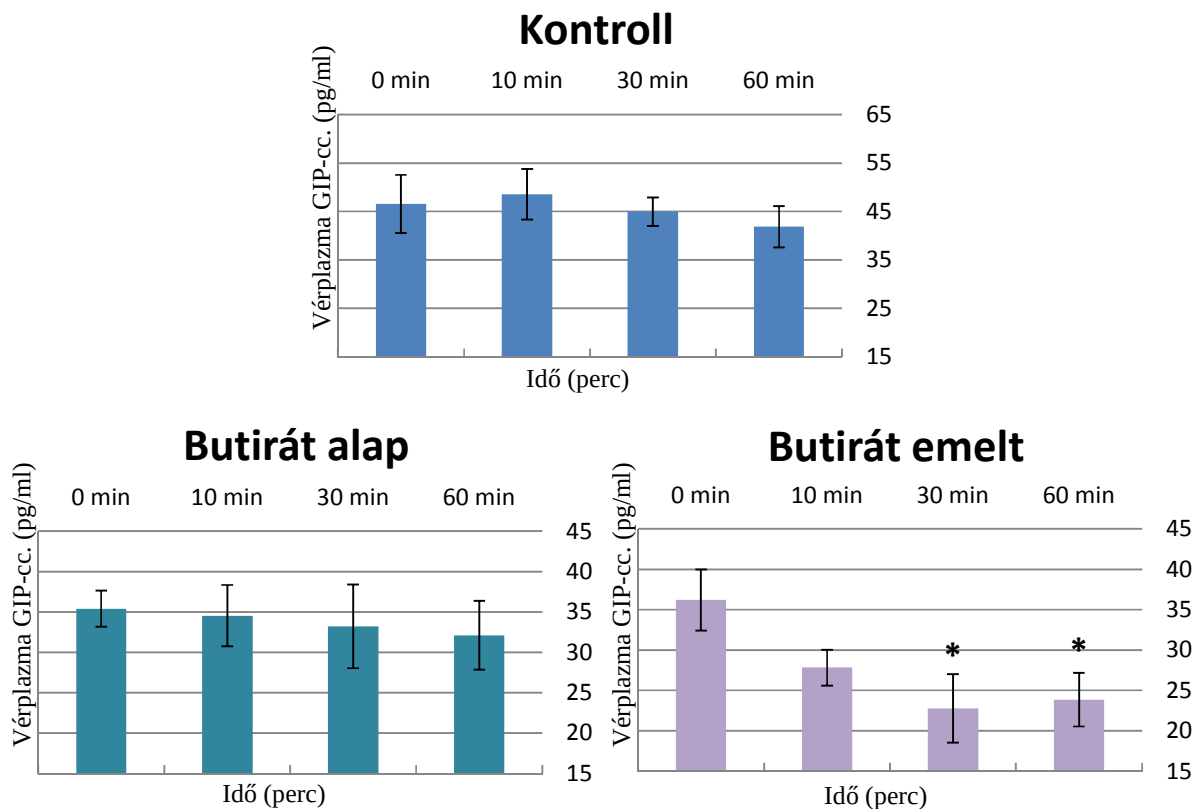
Butirát emelt: nátrium-butirát oldat, 0,5 g/ml, 2,5 ml/ttkg

A beadott butirátmennyiség 0,25 g/ttkg-nak felel meg a „butirát alap” és 1,25 g/ttkg-nak a „butirát emelt” csoport esetében.

*=Szignifikáns eltérés a 0. perchez viszonyítva, $p < 0,05$

**=Szignifikáns eltérés a 0.perchez viszonyítva, $p < 0,01$

n=7/csoport



2. ábra. A vérplazma GIP-koncentrációjának változása butirátkezelés hatására

A három csoportot az alábbiakban szereplő oldatokkal kezeltük begyszondán keresztül a nulladik perces vérvételt (1. vérvétel, 0 min) követően. A vérvételezést megismételtük a 10., 30. és 60. percben. Az oldatok koncentrációja és dózisa:

Kontroll: fiziológiás sóoldat, 2,5 ml/ttkg

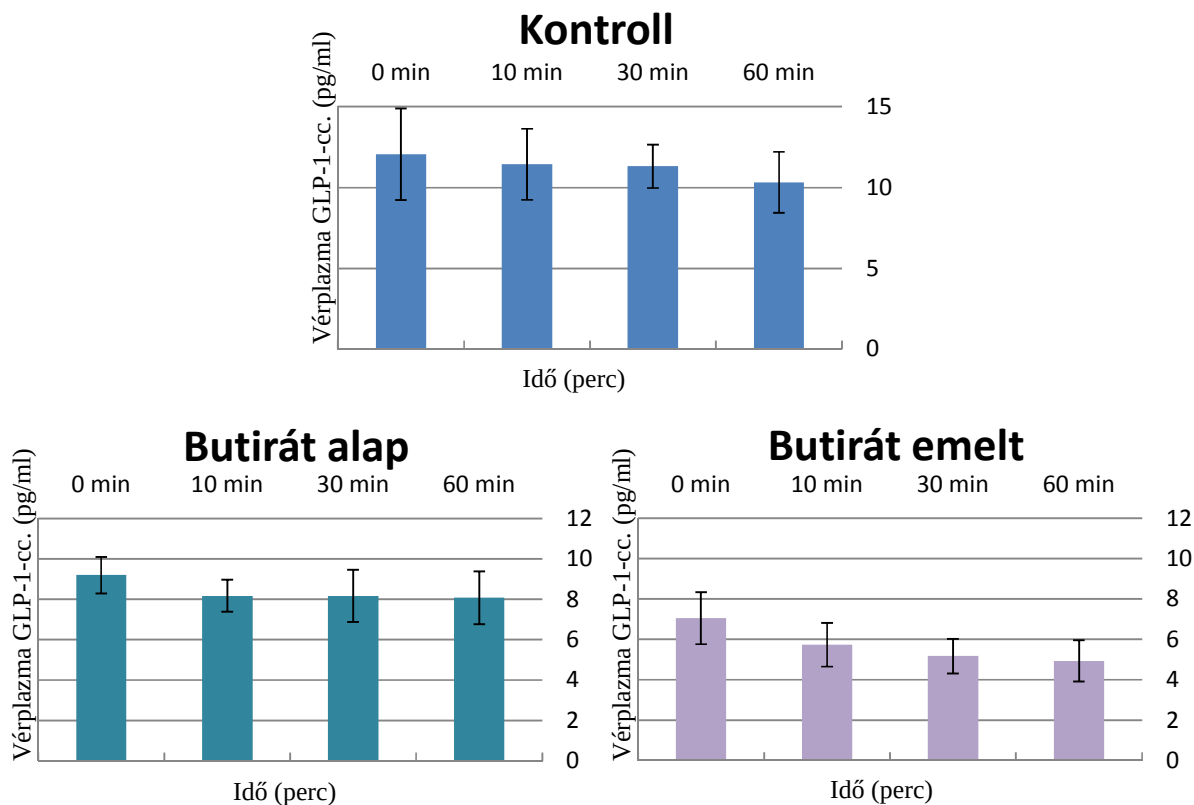
Butirát alap: nátrium-butirát oldat, 0,1 g/ml, 2,5 ml/ttkg

Butirát emelt: nátrium-butirát oldat, 0,5 g/ml, 2,5 ml/ttkg

A beadott butirátmennyiség 0,25 g/ttkg-nak felel meg a „butirát alap” és 1,25 g/ttkg-nak a „butirát emelt” csoport esetében.

*=Szignifikáns eltérés a 0. perchez viszonyítva, $p < 0,05$

n=7/csoport



3. ábra. A vérplazma GLP-1-koncentrációjának változása butirátkezelés hatására

A három csoportot az alábbiakban szereplő oldatokkal kezeltük begyszondán keresztül a nulladik perces vérvételt (1. vérvétel, 0 min) követően. A vérvételezést megismételtük a 10., 30. és 60. percben. Az oldatok koncentrációja és dózisa:

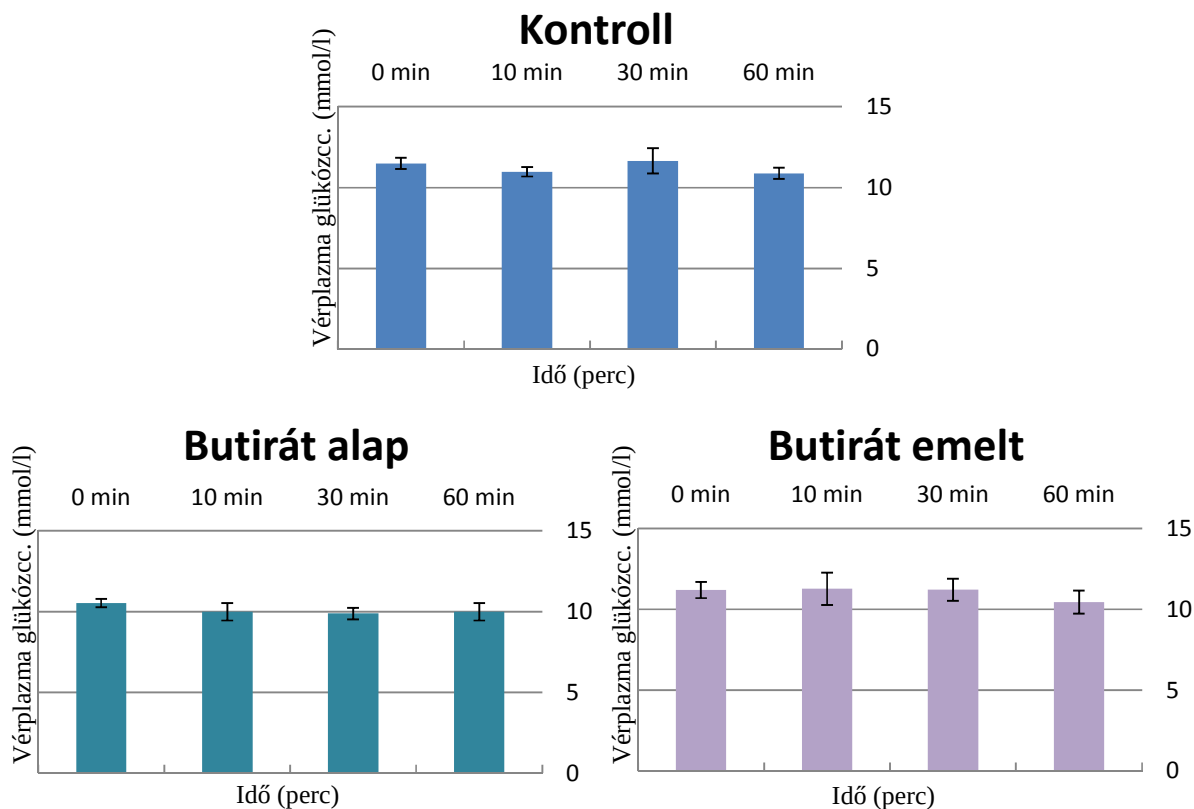
Kontroll: fiziológiás sóoldat, 2,5 ml/ttkg

Butirát alap: nátrium-butirát oldat, 0,1 g/ml, 2,5 ml/ttkg

Butirát emelt: nátrium-butirát oldat, 0,5 g/ml, 2,5 ml/ttkg

A beadott butirátmennyiség 0,25 g/ttkg-nak felel meg a „butirát alap” és 1,25 g/ttkg-nak a „butirát emelt” csoport esetében.

n=7/csoport



4. ábra. A vérplazma glükózkonzentrációjának változása butirátkezelés hatására

A három csoportot az alábbiakban szereplő oldatokkal kezeltük begyszondán keresztül a nulladik perces vérvételt (1. vérvétel, 0 min) követően. A vérvételezést megismételtük a 10., 30. és 60. percben. Az oldatok koncentrációja és dózisa:

Kontroll: fiziológiás sóoldat, 2,5 ml/ttkg

Butirát alap: nátrium-butirát oldat, 0,1 g/ml, 2,5 ml/ttkg

Butirát emelt: nátrium-butirát oldat, 0,5 g/ml, 2,5 ml/ttkg

A beadott butirátmennyiség 0,25 g/ttkg-nak felel meg a „butirát alap” és 1,25 g/ttkg-nak a „butirát emelt” csoport esetében.

n=7/csoport

Megbeszélés

Kísérleti eredményeink szerint az egyszeri, szájon át bolusban adott butirát mindkét alkalmazott dózisban, már 10 perccel a beadás után csökkentette az inzulin plazmakoncentrációját, és emelt dózisban, 30 perces inkubációs idő alatt csökkentette az inkretinek közül a GIP plazmaszintjét. Ezek az adatok jelentősen különböznek más kutatók egéren végzett hasonló vizsgálatainak eredményeitől. Egérben mind az egyszeri, szájon át adott butirát bolus, mind a takarmánykiegészítőként alkalmazott butirát szignifikánsan növelte mindkét inkretin hormon (GIP és GLP-1), valamint az inzulin vérplazma-koncentrációját is (Lin et al., 2012). Ez a jelentős eltérés valószínűleg az emlősök és madarak szénhidrát-anyagcseréjének eltéréseivel magyarázható, és egyben indokolja további kutatások megkezdését a csirke, valamint további madárfajok emésztés-élettanának és szénhidrát-endokrinológiájának bővebb feltárására. Kísérletünk során nem tapasztaltunk szignifikáns változást a GLP-1 plazmaszintjében, ez valószínűleg azzal magyarázható, hogy a beadott butirát bolus már az üres gyomor-bélcsatorna elülső szakaszából (begy, gyomrok) felszívódott, így a későbbi bélszakaszokban található, L-sejtekhez kötött FFA receptorokhoz már nem tudott kötődni, ezért nem hatott a GLP-1 elválasztására. Nem zárható ki azonban az sem, hogy csirkében a butirát az enteroendokrin L-sejtek hormontermelését – azok eltérő száma vagy érzékenysége miatt – kevésbé tudja stimulálni, mint emlősökben.

Tanszékünk kutatócsoportja korábban csirkében már vizsgálta a butirát szénhidrát-anyagcserét befolyásoló hatásait: a kísérlet során a starter periódusban a 20-24. napon az állatokat naponta egyszer (összesen 5 alkalommal, 5 napon keresztül) butirát bolussal kezelték 12 órás takarmánymegvonást követően. Az 5. napi bolus beadását követően vett vérmintákban ez a vérplazma glükóz- és inzulinszintjének szignifikáns emelkedését okozta (Mátis *et al.*, 2014). Ezek az eredmények is szembeállíthatók a jelen kísérletünk során tapasztaltakkal: nem észleltünk szignifikáns változást a vérplazma glükózkoncentrációjában, míg a vérplazma inzulinszintje szignifikánsan csökkent esetünkben. Ez a különбözőség azt mutatja, hogy a butirát, mint takarmányozási faktor eltérőképpen hathat nemcsak az adagolás formájától (bolus, takarmánykiegészítés), hanem a kezelés időtartamától, ismétlődésétől függően is. Lehetséges, hogy a bolusban történő kezelés, mely akut stimulusnak felel meg, és egyszeri magas vérplazma-koncentrációt eredményez, ismételve, több napon keresztül alkalmazva azért okoz eltérő

változásokat, mert a butirát receptorokon való hatásai mérséklődnek a receptorok csökkenő stimulálhatósága miatt. Ilyenkor, feltételezéseink szerint, a butirát inkább epigenetikusan hat az inzulinjelpálya egyes tagjaira, azok expressziójában, aktivitásában okoz változást, és ezáltal csökkenti a szisztémás inzulin-érzékenységet. Ennek a következményeként megnő a vérglükózszint, amit a vér inzulinkoncentrációjának az emelkedése is követ.

Munkacsoportunk további eredményei szerint a butirát takarmánykiegészítőként adva nem befolyásolja szignifikáns mértékben a vérplazma inzulinkoncentrációját sem nátrium-butirát formájában, sem a bélcsatorna kezdeti szakaszain fel nem szívódó, elsősorban az ileumban felszabaduló ún. „védett butirátként” alkalmazva (nem publikált adatok). Ezen eredmények akár felvethetnék a lehetőségét annak is, hogy a biológiai hatások szempontjából nincs döntő szerepe annak, honnan szívódik fel a bélcsatornából a butirát. Ennek ellentmond azonban az, hogy a takarmány NSP (non-starch polysaccharide) tartalmának megnövelésekor, a vastagbélben elszaporodó mikróbák nagyobb mennyiségű butiráttermelése összefüggésbe hozható a vérplazma inzulinszintjének szignifikáns csökkenésével (nem publikált adatok). Azaz jelentős relevanciával bír, hogy butirátkiegészítést adunk egy állatnak vagy a takarmány összetételének változtatásával fokozzuk az endogén butiráttermelést, ugyanis a két esetben jelentősen eltérő hatásokat tapasztalhatunk a szervezetben. A különböző típusú butirátkezelések által a csirke vérplazmájának inzulinkoncentrációjára gyakorolt hatásokat foglalja össze a **3. táblázat**.

3. táblázat. Különböző típusú butirátkezelések hatásai a csirke vérplazmájának inzulinkoncentrációjára

<i>Kezelés típusa</i>	Egyszeri bolus (jelen kísérlet)	Napi egyszeri bolus 5 napon át	Takarmánykiegészítés (Na-butirát, védett butirát)	Endogén butirátszintézis stimulálása (NSP)
<i>Inzulin plazmaszintjének változása</i>	Csökkent	Növekedett	Nincs változás	Csökkent

Jelen kísérletünk fontos célja volt az inkretinek szabályozó szerepének vizsgálata a csirke inzulin-homeosztázisának mediálásában. Az eredményeink alapján feltételezhető, hogy az inkretinek csirkében csak részleges szerepet játszanak az inzulinfelszabadulás szabályozásában, amit az támaszt alá, hogy butirátkezelés hatására (alap és emelt dózis esetén is) már a 10. percben

csökkent az inzulin plazmaszintje, míg az inkretinek közül csak a GIP plazmakoncentrációja változott, és csak az emelt dózisú butirát hatására csökkent szignifikáns mértékben, a 30. perctől kezdődően. Ez ugyanakkor bizonyítja azt is, hogy a butirát egyéb úton – így feltételezhetően az emlősökhöz hasonló módon közvetlenül befolyásolva a β -sejtek működését – is hat az inzulinfelszabadulásra, amit már az inkretin hormonok plazmaszintjének változása előtt képest kiváltani. Fontos kiemelni, hogy mind az inzulin, mind a GIP plazmakoncentrációja egy irányba változott az emelt dózisú butirátkezelés esetén, ami alátámasztja az inkretinek emlősben már leírt szerepét az inzulin-homeosztázis szabályozásában, de ugyanakkor rámutat arra, hogy ez a szabályozó szerep csirkében valószínűleg csak részleges.

Kísérleti eredményeinket összefoglalva megállapítható, hogy a csirke szénhidrát-háztartásának szabályozása, illetve befolyásolhatósága jelentősen eltér az emlősökétől, így vizsgálataink, illetve a felmerülő további kérdések összehasonlító biokémiai szempontból is nagy jelentőséggel bírnak. Eredményeink alátámasztják, hogy a butirát fontos szereppel bír a csirke szénhidrát-anyagcseréjének szabályozásában, amely részben az inkretinek közvetítő szerepével valósulhat meg. A csirkék inzulin-homeosztázisának, illetve annak takarmánykiegészítőkkel való befolyásolhatóságának alaposabb feltárása azonban további vizsgálatokat igényel, amelyek termelésélettani szempontból is értékes eredményeket hozhatnak.

Összefoglalás

A csirkék szénhidrát-anyagcseréje jelentősen különbözik az emlősökétől: a vérplazma élettani körülmények között is jóval magasabb glükózkoncentrációja, valamint az extrahepatikus szövetek csökkent inzulinérékenysége jellemzi. Mivel a csirke növekedési erélye igen nagy, és az izomtömeg-gyarapodás is intenzív, így a fehérjeszintézisben jelentős szereppel bíró inzulin homeosztázisának, hatásmechanizmusának és ezek befolyásolhatóságának tanulmányozása e fajban különösen fontos. Az inzulin elválasztását számos endokrin tényező, elsősorban az ún. inkretin hormonok (Glucose-dependent insulintropic polypeptide, GIP; Glucagon-like peptide 1, GLP-1) szabályozzák. Kutatásunk során az inkretinek inzulin-homeosztázis szabályozásában betöltött szerepét, illetve azok takarmányozási faktorokkal, esetünkben nátrium-butiráttal való befolyásolhatóságát kívántuk vizsgálni csirkében.

Munkánk során 24 napos, hímváru, Ross 308 típusú brojlercsirkéket vizsgáltunk. A kísérletbe 21 állatot vontunk be ($n=7$ /csoport), melyeket a Ross szabvány szerint összeállított indítótáppal takarmányoztunk. A 24. napon 12 órás takarmánymegvonást követően az állatokat egyszeri, szájon át beadott nátrium-butiráttal bolussal kezeltük (0; 0,25; 1,25 g/ttkg). A kezelést megelőzően vért vettünk a szárnyvénákból, majd ezt megismételtük a kezelést követő 10., 30. és 60. percekben. A plazmamintákból ELISA módszerrel meghatároztuk az inzulin, GIP és GLP-1 hormonok, illetve spektrofotometriás módszerrel a glükóz koncentrációját.

Az eredmények kiértékelése során megállapítottuk, hogy az inzulin esetében mindkét, a GIP esetében pedig csak az emelt dózisú butirát szignifikánsan csökkentette a hormonok plazmakoncentrációját a 0. perces kontrollhoz képest, míg a GLP-1 és a glükóz esetében nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget.

A kapott adatok nem esnek egybe a más kutatók által egérben végzett kísérletek eredményeivel, ahol a szájon át adott butirát emelte az inkretinek és az inzulin plazmakoncentrációját. Ezek az eltérések feltehetően az állatfajok közötti jelentős élettani különbségekkel lehetnek összefüggésben. Munkánk eredményei azt mutatják, hogy az inkretinek csirkében csak részben felelősek az inzulin-szekréció szabályozásáért, egyben rámutatnak arra, hogy az inzulin-homeosztázis takarmányozási faktorok segítségével befolyásolható. Kísérletünk igazolta, hogy a butirátnak jelentős szerepe van a csirke szénhidrát-anyagcseréjének szabályozásában, amely részben az inkretinek közvetítő szerepével valósulhat meg.

Summary

The carbohydrate homeostasis in chicken is greatly different from that of mammals: the physiological blood glucose level is higher, and the insulin sensitivity of the extrahepatic tissues is decreased compared to mammals. Since chickens have high growth and muscle protein synthesis rates, regulated mostly by insulin, the investigation of insulin's homeostasis and the examination of possible ways for affecting its regulation can be of special importance. The insulin release is regulated by many endocrine factors, primarily by incretins, which are the GIP (Glucose-dependent Insulinotropic Peptide) and the GLP-1 (Glucagon-like Peptide 1). In the present study, we aimed to examine the role of incretins in the regulation of insulin homeostasis in chicken, as well as to focus on its modulation by nutritional factors, such as the commonly applied feed additive, sodium butyrate in our case.

Twenty-four-day old, male Ross 308 type broiler chickens were included in our experiment. Twenty-one chickens were housed in groups (n=7/group) and fed with starter diet according to the Ross standard. On day 24, following an overnight feed deprivation, the animals were treated with a single orally applied sodium butyrate bolus (0; 0,25; 1,25 g/kg BW). Before the treatment, blood samples were drawn from the wing veins (0. min) and this was repeated after the treatment three times (10., 30., 60. min). From plasma samples the insulin, GIP and GLP1 hormone concentrations were determined with ELISA method, and the glucose concentrations with a spectrophotometric assay.

According to our results, we found that in the case of insulin, both doses, and in the case of GIP, only the higher dose of butyrate lowered the plasma concentrations of hormones compared to the 0. minute control, while in the case of GLP-1 and glucose, no significant changes were found.

Our findings aren't in full consonance with other researchers' results, where the orally applied butyrate raised the plasma concentration of incretins and insulin in mice. These can be associated with the species-related significant differences in carbohydrate metabolism. Our results show that the incretins are only partially responsible for the regulation of insulin release in chicken, and also reveal that the insulin homeostasis can be modified by nutritional factors. This study justifies that the butyrate has a significant role in regulating the insulin homeostasis of chickens, which role may be partly mediated by incretins.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom a tudományos diákköri dolgozatom létrejöttének segítéséért, elévülhetetlen közreműködésükért és segítségnyújtásukért témavezetőimnek, Dr. Mátis Gábornak és Dr. Neogrády Zsuzsannának. 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 a közreműködését, külön köszönettel tartozom Kulcsár Annának a statisztikai elemzések elkészítésében és a kísérletek elvégzésében való segítségéért, Kulcsárné dr. Petrilla Jankának, Ézsiás Anikónak és Seprődi Júliának pedig a kísérletek előkészítésében, illetve adminisztrációjában való részvételéért.

Irodalomjegyzék

- BAGGIO, L. L. AND DRUCKER, D. J. (2007): Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*, 132(6):2131-57.
- BRAUN, E. J. AND SWEAZEA, K. L. (2008): Glucose regulation in birds. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, 151. 1–9.
- CARVER, F. M., SHIBLEY, I. A., PENNINGTON, J. S. AND PENNINGTON, S. N. (2001): Differential expression of glucose transporters during chick embryogenesis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 58. 645–652.
- COUDERT, E., DUPONT, J., SIMON, J., CAILLEAU-AUDOUIN, E., CROCHET, S., DUCLOS, M. J., TESSERAUD, S. AND MÉTAYER-COUSTARD, S. (2013): First evidence of an insulin-sensitive glucose transporter in chicken: GLUT-12. *The European Association for Animal Production*, 134. 391–392.
- DANBY, R. W., MARTIN, I. K. AND GIBSON, W. R. (1982): Effects of pancreatectomy, tolbutamide, and insulin on glucose fluxes in chickens. *Journal of Endocrinology*, 94. 429–441.
- DOYLE M. E., AND EGAN J. M. (2007): Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas. *Pharmacology & Therapeutics*, 113:546–593.
- DOYLE, J. (2010): A review of Histone Deacetylase inhibitors and their application in veterinary medicine. *Szakdolgozat, SzIE ÁOTK, Budapest*
- DUPONT, J., DAGOU, C., DEROUET, M., SIMON, J. AND TAOUIS, M. (2004): Early steps of insulin receptor signaling in chicken and rat: apparent refractoriness in chicken muscle. *Domestic Animal Endocrinology*, 26. 127–142.
- FERNÁNDEZ-RUBIO, C., ORDÓÑEZ, C., ABAD-GONZÁLEZ, J., GARCIA-GALLEGO, A., HONRUBIA, M. P., MALLO, J. J. AND BALANA-FOUCE, R. (2008): Butyric acid based feed additives help protect broiler chickens from *Salmonella enteritidis* infection. *Poultry Science*, 88, 943-948.
- FRIEDMAN, A. AND BAR-SHIRA, E. (2005): Effect of nutrition on development of immune competence in chickens gut associated lymphoid system. *Poultry Nutrition*, pp. 234-242 in Proc. 15th Eur. Symp. WPSA, Balatonfüred, Hungary.
- GAO, F., JIANG, Y., ZHOU, G. H. AND HAN, Z. K. (2007): The effects of xylanase supplementation on growth, digestion, circulating hormone and metabolite levels, immunity and gut microflora in cockerels fed on wheat-based diets. *British Poultry Science*, 48. 480–488.

- GAO, Z., YIN, J., ZHANG, J., WARD, R. E., MARTIN, R. J., LEFEVRE, M., CEFALU, W. T. AND YE, J. (2009): Butyrate improves insulin sensitivity and increases energy expenditure in mice. *Diabetes*, 58, 1509-1517.
- GARRIGA, C., ROVIRA, N., MORETÓ, M. AND PLANAS, J. M. (1999): Expression of Na⁺-D-glucose cotransporter in brush-border membrane of the chicken intestine. *American Journal of Physiology*, 276. 627–631.
- GUILLOTEAU, P., MARTIN, L., EECKHAUT, 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.
- HAZELWOOD, R. L. (1973): The avian endocrine pancreas. *American Zoologist*, 13. 699–709.
- HAZELWOOD, R. L. (1986): Carbohydrate metabolism. In: Sturkie, P.D. (ed.): *Avian Physiology* (fourth ed). *Cornell University Press*, New York, 303–325.
- HOLST, J. J., VILSBØLL, T., DEACON, C. F. (2009): The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 15;297(1-2):127-36. doi: 10.1016/j.mce.2008.08.012. Epub 2008 Aug 20.
- HONEY, R. N., ARIMURA, A. AND WEIR, G. C. (1981): Somatostatin neutralization stimulates glucagon and insulin secretion from the avian pancreas. *Endocrinology*, 109. 1971–1974.
- JENNI, L. AND JENNI-EIERMANN, S. (1998): Fuel supply and metabolic constraints in migrating birds. *Journal of Avian Biology*, 29. 521–528.
- JOHNSTONE, R. M., MATHEW, A., SETCHENSKA, M. S., GRDISA, M. AND WHITE, M. K. (1998): Loss of glucose transport in developing avian red cells. *European Journal of Cell Biology*, 75. 66–77.
- JÓZEFIAK, D., PTAK, A., KACZMAREK, S., MACKOWIAK, P., SASSEK, M., AND SLOMINSKI, B. A. (2010): Multi-carbohydrase and phytase supplementation improves growth performance and liver insulin receptor sensitivity in broiler chickens fed diets containing full-fat rapeseed. *British Poultry Science*, 89. 1939–1946.
- KIM, W. AND EGAN, J.M. (2008): The Role of Incretins in Glucose Homeostasis and Diabetes Treatment. *Pharmacological Reviews*, 60(4): 470–512. doi:10.1124/pr.108.000604.
- KLAASSEN, M., KVIST, A. AND LINDSTRÖM, A. (2000): Flight costs and fuel composition of a bird migrating in a wind tunnel. *The Condor*, 102. 444–451.

- KONO, T., NISHIDA, M., NISHIKI, Y., SEKI, Y., SATO, K. AND AKIBA Y. (2005): Characterisation of glucose transporter (GLUT) gene expression in broiler chickens. *British Poultry Science*, 46. 510–515.
- LIN H. V., FRASSETTO A., KOWALIK E. J. JR., NAWROCKI A. R., LU M. M., KOSINSKI, J. R., HUBERT, J. A., SZETO, D., YAO, X., FORREST, G. AND MARSH, D. J. (2012): Butyrate and Propionate Protect against Diet-Induced Obesity and Regulate Gut Hormones via Free Fatty Acid Receptor 3-Independent Mechanisms. *PLoS ONE*, 7(4): e35240. doi:10.1371/journal.pone.0035240.
- MÁTIS, G. (2013): Effects of butyrate on hepatic epigenetics and microsomal drug-metabolizing enzymes in chicken. *PhD thesis*.
- MÁTIS, G., KULCSÁR, A., TUROWSKI, V., FÉBEL, H., NEOGRÁDY, ZS. AND HUBER, K. (2014): Effects of oral butyrate application on insulin signaling in various tissues of chickens. *Domestic Animal Endocrinology*, 7;50C:26-31. doi: 10.1016/j.domaniend.2014.07.004.
- MÁTIS, G., NEOGRÁDY, ZS., CSIKÓ, GY., KULCSÁR, A., KENÉZ, Á. AND HUBER, K. (2013): Effects of orally applied butyrate bolus on histone acetylation and cytochrome P450 enzyme activity in the liver of chicken – a randomized controlled trial. *Nutrition & Metabolism*, 10:12 doi:10.1186/1743-7075-10-12.
- MORGAN, C. L. AND BRAUN, E. J. (2001): Glucose handling by the kidney of the domestic fowl. *The FASEB Journal*, 15. A854.
- MÖLLER, W. AND KUMMER, W. (2003): The blood-brain barrier of the chick glycogen body (corpus gelatinosum) and its functional implications. *Cell and Tissue Research*, 313. 71–80.
- PARKER, G. H. AND GEORGE, J. C. (1976): Effects of intense exercise on intracellular glycogen and fat in pigeon pectoralis. *Acta Anatomica*, 96. 568–573.
- RICKE, S. C. (2003): Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobiols. *Poultry Science*, 82, 632-639.
- RIESENFELD, G., GEVA, A. AND HURWITZ, S. (1982): Glucose homeostasis in the chicken. *Journal of Nutrition*, 112. 2261–2266.
- ROSS BROILER MANAGEMENT MANUAL (2009):
http://www.poultryhub.org/wpcontent/uploads/2012/06/Ross_US_Broiler_Manual_09.pdf.
- RUFFIER, L., SIMON, J. AND RIDEAU, N. (1998): Isolation of functional glucagon islets of Langerhans from the chicken pancreas. *General and Comparative Endocrinology*, 112. 153–162.

- SAKURAI, H., DOBBS, R. AND UNGER, R. H. (1974): Somatostatin-induced changes in insulin and glucagon secretion in normal and diabetic dogs. *The Journal of Clinical Investigation*, 54. 1395–1402.
- SATO, K., AOKI, M., KONDO, R., MATSUSHITA, K., AKIBA, Y. AND KAMADA T. (2012): Administration of insulin to newly hatched chicks improves growth performance via impairment of MyoD gene expression and enhancement of cell proliferation in chicken myoblasts. *General and Comparative Endocrinology*, 175. 457–463.
- SEGAIN, J. P., RAINGEARD DE LA BLÉTIČRE, D., BOURREILLE, A., LERAY, V., GERVOIS, N., ROSALES, C., FERRIER, L., BONNET, C., BLOTTIČRE, H. M. AND GALMICHE, J. P. (2000): Butyrate inhibits inflammatory responses through NFkappaB inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47, 397-403.
- SHEPHERD, P. R. AND KAHN, B. B. (1999): Review article: glucose transporters and insulin action: Implications for insulin resistance and DM. *The New England Journal of Medicine*, 341. 248–257.
- SIMON, J. (1989): Chicken as a useful species for the comprehension of insulin action. *Critical Reviews in Poultry Biology*, 2. 121–148.
- SITBON, G. AND MIALHE, P. (1980): The endocrine pancreas of birds. *The Journal of Physiology*, 76. 5–24.
- THURSTON, R. J., BRYANT, C. C. AND KORN, N. (1993): The effects of corticosterone and catecholamine infusion on plasma glucose levels in chicken (*Gallus domesticus*) and turkey (*Meleagris gallopavo*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C*, 106. 59–62.
- TINKER, D. A., BROSNAN, J. T. AND HERZBERG, G. R. (1986): Interorgan metabolism of amino acids, glucose, lactate, glycerol and uric acid in the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *The Journal of Biochemistry*, 240. 829–836.
- TOKUSHIMA, Y., TAKAHASHI, K., SATO K. AND AKIBA Y. (2005): Glucose uptake in vivo in skeletal muscles of insulin-injected chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, 141. 43–48.
- VAN IMMERSEEL, F., BOYEN, I., GANTOIS, L., TIMBERMONT, L., BOHEZ, L., PASMANS, F., HAESEBROUCK 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.

- VASILATOS-YOUNKEN, R., CRAVENER, T. L., COGBURN, L. A., MAST, M. G. AND WELLENREITER, R. H. (1988): Effect of pattern of administration on the response to exogenous, pituitary-derived chicken growth hormone by broiler-strain pullets. *General and Comparative Endocrinology*, 71. 268–283.
- VELÁZQUEZ, O. C., LEDERER, H. M. AND ROMBEAU, J. L (1997): Butyrate and the colonocyte. Production, absorption, metabolism, and therapeutic implications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 427, 123-134.
- WATANABE, T., NISHIMURA, K., HOSAKA, Y. Z., SHIMOSATO, T., YONEKURA, S., SUZUKI, D., TAKEMOTO, C., MONIR, M. M. AND HIRAMATSU, K. (2014): Histological analysis of glucagon-like peptide-1 receptor expression in chicken pancreas. *Cell and Tissue Research*, 357(1):55-61. doi: 10.1007/s00441-014-1836-6.
- WHITE, M. F. AND KAHN, C. R. (1994): The insulin signaling system. *The Journal of Biological Chemistry*, 269. 1–4.