

**DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS**

**CSERNUS BRIGITTA**

**DEBRECEN**

**2022.**

**DEBRECENI EGYETEM**  
**ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA**

*Doktori Iskola vezető:*

**Dr. Komlósi István D.Sc.**

egyetemi tanár  
az MTA doktora

*Témavezető:*

**Dr. Czeglédi Levente Ph.D.**

egyetemi tanár

**BIOAKTÍV NÖVÉNYI HATÓANYAGOK HATÁSA  
A BROJLERCSIRKE ÉS A PONTY IMMUNOLÓGIAI  
PARAMÉTEREIRE, AZ INTESZTINÁLIS MORFOLÓGIÁRA  
ÉS A MIKROBIOTÁRA**

*Készítette:*

**Csernus Brigitta**

doktorjelölt

**Debrecen**

**2022.**

**BIOAKTÍV NÖVÉNYI HATÓANYAGOK HATÁSA  
A BROJLERCSIRKE ÉS A PONTY IMMUNOLÓGIAI  
PARAMÉTEREIRE, AZ INTESZTINÁLIS MORFOLÓGIÁRA  
ÉS A MIKROBIOTÁRA**

**Értekezés a doktori (Ph.D.) fokozat megszerzése érdekében  
az állattenyésztési tudományok tudományágban**

**Írta: Csernus Brigitta** okleveles élelmiszerbiztonsági  
és -minőségi mérnök

Készült a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola  
(Állati-termék előállítás programja) keretében

Témavezető:           Dr. Czeglédi Levente Ph.D.

**Az értekezés bírálói:**

név	fokozat	aláírás
.....	.....	.....
.....	.....	.....

**A bírálóbizottság:**

	név	fokozat	aláírás
elnök:	.....	.....	.....
tagok:	.....	.....	.....
	.....	.....	.....
titkár:	.....	.....	.....

Az értekezés védésének időpontja: 2022. ....

# TARTALOMJEGYZÉK

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
<b>1. BEVEZETÉS .....</b>	<b>7</b>
<b>2. CÉLKITŰZÉS .....</b>	<b>8</b>
<b>3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....</b>	<b>10</b>
3.1 Az antibiotikum-felhasználás és a mezőgazdaságban kialakuló antibiotikum-rezisztencia .....	10
3.2 Természetes hatóanyagok, mint lehetséges alternatívák .....	11
3.3 A kutatásban alkalmazott bioaktív növényi hatóanyagok .....	14
3.4 A madarak immunrendszerének felépítése .....	17
3.4.1 A madarak immunszervei .....	17
3.4.2 A madarak veleszületett immunitása .....	19
3.4.3 A madarak szerzett (specifikus) immunitása .....	22
3.5 A házityúk intesztinális mikrobiota-összetétele és az immunhomeosztázis kapcsolata .....	24
3.6 A halak immunrendszerének felépítése .....	27
3.6.1 A halak immunszervei .....	27
3.6.2 A halak nemspecifikus immunitása .....	29
3.6.3 A halak specifikus immunitása .....	32
<b>4. ANYAG ÉS MÓDSZER .....</b>	<b>34</b>
4.1 A növényi kivonatok előállítása .....	34
4.2 Brojlerscirkeivel végzett vizsgálatok .....	38
4.2.1 A kísérleti beállítás és mintavétel .....	38
4.2.2 RNS izolálás és cDNS szintézis .....	40
4.2.3 Kvantitatív PCR (qPCR) .....	41
4.2.4 ELISA módszer .....	45
4.2.5 Bakteriális DNS izolálás és a polimeráz láncreakció (PCR) .....	47
4.2.6 Intesztinális morfológiai vizsgálat .....	51
4.2.7 Viselkedés-megfigyelés .....	52
4.3 Ponttyal végzett vizsgálatok .....	53
4.3.1 A kísérleti beállítás és mintavétel .....	53
4.3.2 RNS izolálás és cDNS szintézis .....	54
4.3.3 Kvantitatív PCR (qPCR) .....	55
4.3.4 Intesztinális morfológiai vizsgálat .....	58

4.4 Statisztikai analízis .....	59
<b>5. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE .....</b>	<b>60</b>
5.1 A brojlercsirkevel végzett vizsgálatok eredményei .....	60
5.1.1 A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke termelési paramétereire.....	60
5.1.2 A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke immunológiai paramétereire.....	61
5.1.3 A bioaktív hatóanyagok hatása a brojlercsirke intesztinális morfológiájára .....	74
5.1.4 A bioaktív hatóanyagok hatása a brojlercsirke bél-mikrobiota összetételére .....	77
5.1.5 A bioaktív hatóanyagok hatása a brojlercsirke viselkedésére.....	80
5.2 A ponttyal végzett vizsgálatok eredményei .....	84
5.2.1 A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a ponty immunológiai paramétereire ..	84
5.2.2 A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a ponty intesztinális morfológiájára....	88
<b>6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....</b>	<b>91</b>
<b>7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....</b>	<b>94</b>
<b>8. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK .....</b>	<b>96</b>
<b>9. ÖSSZEFOGLALÁS .....</b>	<b>97</b>
<b>10. SUMMARY .....</b>	<b>100</b>
<b>11. IRODALOMJEGYZÉK .....</b>	<b>103</b>
<b>PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN.....</b>	<b>132</b>
<b>KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....</b>	<b>135</b>
<b>MELLÉKLETEK .....</b>	<b>137</b>
<b>NYILATKOZATOK .....</b>	<b>138</b>

## RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

RNS	ribonukleinsav
40S	40S riboszómális fehérje
ACTB	béta-aktin
AMEn	látszólagos metabolizálható energia zéró nitrogénretencióra korigálva
ANOVA	egyutas varianciaanalízis
APC	antigénprezentáló sejt
<i>C. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
CD8+ T-sejt	citotoxikus T-sejt
cDNS	komplementer DNS
COX-1	ciclooxygenáz-1 enzim
COX-2	ciclooxygenáz-2 enzim
CRP	C-reaktív fehérje
Ct	küszöbértékhez tartozó ciklusszám
CXC kemokin	kemokin, a két N-terminális ciszteinjét egy aminosav választja el
DAD	diódasoros detektálás
DDGS	szárított gabonatörköly
DE	emészthető energia
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxinukleotid-trifoszfát
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat
ELR	glutamát-leucin-arginin motívum
FID	lángionizációs detektálás
GALT	emésztőrendszerhez kapcsolódó limfoid szövetek
GAPDH	gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

HALT	Harderian- és kötőhártyához kapcsolódó limfoid szövetek
HPLC	nagy teljesítményű folyadékkromatográfia
IFN	I-es típusú interferon útvonal
IFN- $\alpha$	interferon-alfa
IFN- $\gamma$	interferon-gamma
IgA	immunoglobulin A
IgE	immunoglobulin E
IgG	immunoglobulin G
IgM	immunoglobulin M
IgY	immunoglobulin Y
Ig $\delta$ /IgD	immunoglobulin D
IL-10	interleukin-10
IL-18	interleukin-18
IL-1 $\beta$	interleukin-1béta
IL-4	interleukin-4
IL-6	interleukin-6
IL-8	interleukin-8
IRF-1	interferon szabályozó faktor-1
LPS	lipopoliszacharid
MAPK	mitogén-aktivált protein kináz útvonal
MgCl <sub>2</sub>	magnézium-klorid
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex
MMC	melanomakrofág-központ
MMLV	Moloney rágcsőleukémia vírus típusú reverz transzkriptáz
mRNS	hírvivő ribonukleinsav
NDM	Új-Delhi metallo-béta-laktamáz enzimet kódoló gén
NF- $\kappa$ B	nukleáris faktor-kappa B útvonal

NK-sejtek	természetes ölüsejtek
NLR	NOD-szerű receptor
PALS	peri-arterioláris limfoid hüvely
PAMP	patogénekre jellemző molekuláris mintázat
PBS	foszfáttal pufferolt sóoldat
PCR	polimeráz láncreakció
PRRs	mintázatfelismerő receptorok
PWP	peri-ellipszoidális limfoid hüvely
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció
RMSE	átlagos négyzetes hiba gyöke
RN18S	18S riboszómális RNS
SEM	az átlag szórásából adódó standard hiba
SRBC	bárányból származó vörösvérsejt
TGF- $\beta$ 4	transzformáló növekedési faktor béta 4
Th sejtek	segítő T-sejtek
TLR-15	toll-like receptor 15
TLR-21	toll-like receptor 21
TLR-4	toll-like receptor 4
TLR-5	toll-like receptor 5
TMB	3,3',5,5'-tetrametil-benzidin
TNF- $\alpha$	tumor nekrozis faktor alfa
UHPLC	ultranagy-hatékonyságú folyadékkromatográfia
UV-VIS	ultraibolya-látható hullámhossz tartományú detektálás

## 1. BEVEZETÉS

A gazdasági állatfajok egészségi állapotát és termelését számos betegség veszélyezteti, melyek közül a bakteriális eredetű fertőzéseket gyógyszeres kezeléssel, antibiotikumok alkalmazásával gyógyítják (VARGA és mtsai, 2007). Az állattenyésztésben az antimikrobás szerek felhasználása azonban jelentős mennyiségben történik, ami a jelenlévő rezisztens patogének szempontjából ad okot aggodalomra (HOELZER és mtsai, 2017). A rezisztens kórokozók jónéhány útvonalon keresztül a fogyasztókhöz is eljuthatnak (CHANG és mtsai, 2015). Az antibiotikum-felhasználás csökkentésének, ezáltal a további rezisztencia kialakulásának megelőzése, valamint a fogyasztókra veszélyt jelentő egészségügyi kockázat megszüntetése érdekében fontos szerepet kapnak azok a természetes hatóanyagok, melyek természetes úton segítik az állati szervezet védekezőképességének kialakulását (AHAD és mtsai, 2017). Ezen hatóanyagok származhatnak az élesztőgombából, illetve különféle növényekből: olyan összetevőkről van szó, melyek lehetséges immunmoduláns hatással rendelkeznek. Jellemző továbbá a probiotikumok és prebiotikumok alkalmazása is, melyek közül az előbbi élő mikroorganizmusok összességét jelenti és a gazdaszervezet előnyös egészségi állapotát idézi elő, az utóbbi pedig emészthetetlen oligoszacharidok keverékéből áll és a béltraktus probiotikus mikroorganizmusainak élettevékenységét fokozza, ezáltal befolyásolja az immunrendszer működését (REZAEI és mtsai, 2015; BABU és mtsai, 2012).

Az immunrendszer két részre – a madaraknál veleszületett és szerzett, a halaknál nonspecifikus és specifikus immunválaszra – tagolható. Mindkét immunitás részeként a citokinek azok a fehérjék, melyek azonnal felszabadulnak, amint kórokozó vagy „idegen” anyag kerül a szervezetbe. Szerepük a sejt-kommunikáció szabályozásában és az információközvetítésben van, ezáltal a celluláris immunválasz hírvivő molekulái. Az immunoglobulinok a humorális immunitás antitest-aktivitással rendelkező glikoproteinjei (DAVISON és mtsai, 2008).

Az immunológiai homeosztázisban fontos szerepe van a gasztrointesztinális mikrobiotának is, ami fizikai gátat képez és megakadályozza a kórokozók megtapadását, valamint a toxikus metabolitok termelődését. A béltraktus mikrobaközösségének összetétele és a veleszületett immunitás közötti kezdeti interakció megalapozza a későbbi, adaptív immunválasz kialakulását (PAN és YU, 2014).

Mindemellett kiemelt szerepe van a bél morfológiai állapotának is, ami a táplálóanyagok felszívódását, hasznosulását eredményezi.

Korábbi tanulmányok alapján a természetes, növényi eredetű vagy gombából származó hatóanyagok pozitívan befolyásolhatják a brojlercsirke és a ponty citokinek expresszióját, az immunoglobulinok szintjét, valamint a béltraktus mikrobiota-összetételét és morfológiai képleteit – ebből adódóan, képesek lehetnek a gazdaszervezet immunitásának fokozására.

## 2. CÉLKITŰZÉS

Kutatásunk során célul tűztük ki az általunk alkalmazott karotinoidok, oligoszacharidok (prebiotikumok) és antocianinok – mint lehetséges immunmodulánsok – hatásának vizsgálatát a brojlercsirke és a ponty immunológiai, intesztinális morfológiai paramétereire, valamint a brojlercsirke béltraktus mikrobiotára nézve. A pontos vizsgálatokat az alábbi kísérletek foglalják össze:

### **Brojlercsirkével végzett kísérlet:**

1. Meghatározzuk a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok hatását a brojlercsirke bizonyos termelési paramétereire (élősúly, átlagos napi súlygyarapodás, átlagos napi takarmányfelvétel).
2. Megvizsgáljuk a felsorolt hatóanyagok hatását a brojlercsirke immunológiai paramétereire, mely hatás igazolását génexpressziós vizsgálatok keretében – mRNS szinten – végezzük az alábbi citokinek esetén: interleukin-1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ), interleukin-6 (*IL-6*), interferon- $\alpha$  (*IFN- $\alpha$* ), interferon- $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ), toll-like receptor 4 (*TLR-4*), és toll-like receptor 5 (*TLR-5*).
3. Megvizsgáljuk továbbá a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok hatását a brojlercsirke immunválaszának kialakulásában részt vevő citokinekre és immunoglobulinra, fehérjeszinten az IL-1 $\beta$ , az IL-6 és az IgG esetén.

4. Elvégezzük a bioaktív hatóanyagok hatásának vizsgálatát a brojlerek béltraktusának mikrobiotájára nézve, így DNS vizsgálatokkal meghatározzuk az alábbi baktériumcsoportok relatív arányát: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Escherichia coli*.
5. Fontosnak tartjuk a hatóanyagok táplálóanyag-felszívódásra gyakorolt hatásának megállapítását is, ezáltal elvégezzük a felsorolt intesztinális morfológiai paraméterek mérését: villushossz, kriptomélység, a villushossz és a kriptomélység aránya, teljes bélnyálkahártyaréteg-vastagság.
6. A már ismertetett hatóanyagoknak a brojlerek viselkedésére gyakorolt hatását is megvizsgáljuk, melynél az alábbi viselkedésformákat figyeljük meg: takarmánycsipegetés, ivóvízfogyasztás, szárnynyújtogatás, pihenés, járkálás.

#### **Ponttyal végzett kísérlet:**

1. A karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok lehetséges immunstimuláló hatását a pontynál is meghatározzuk, génexpressziós vizsgálatok keretében az alábbi citokineknél: interleukin-1 $\beta$  (*IL-1 $\beta$* ), interleukin-8 (*IL-8*), tumor nekrosis faktor- $\alpha$  (*TNF- $\alpha$* ), interferon szabályozó faktor-1 (*IRF-1*).
2. Megvizsgáljuk a bioaktív hatóanyagok ponty-béltraktus morfológiájára gyakorolt hatását is, melynél az alábbi paramétereket vesszük figyelembe: villushossz, villusszélesség, bélfal izomréteg-vastagság.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1 Az antibiotikum-felhasználás és a mezőgazdaságban kialakuló antibiotikum-rezisztencia

Antibiotikumoknak nevezzük azokat a kémiai anyagokat, amelyek természetes úton termelődnek, vagy amelyet szintetikusán állítanak elő és a baktériumok növekedését gátló (bakteriosztatikus), valamint baktériumokat pusztító (baktericid) tulajdonsággal rendelkeznek (MILIĆ és mtsai, 2013; MARTÍNEZ, 2012; GILLINGS, 2013). Az antibiotikumok megfelelő, terápiás célú felhasználása elengedhetetlen a gazdasági állatfajok fertőzéseinek kezelésére, ám az antimikrobás készítményeket számos esetben alkalmazzák egészséges állományban is, valamely fertőzés kialakulásának megakadályozására (EUROPEAN COMMISSION). Az antimikrobás szerek felhasználása hazánkban is jelentős, az Európai Unió tagállamai közül Magyarország a 2018-as évben az állatgyógyászat terén az ötödik legtöbb antibiotikumot alkalmazó ország volt (EMA, 2020. 12. 12.)

A felhasznált antibiotikumok mennyiségének csökkentése globális szintű célt képez, ugyanis a mezőgazdaságban megjelenő rezisztens patogének egyre inkább növekvő aggályt idéznek elő (EUROPEAN COMMISSION; HOELZER és mtsai, 2017). A rezisztens baktériumok számos útvonalon keresztül megjelenhetnek a humán populációban: az állatokról közvetlenül az emberre kerülhetnek, továbbá az általuk szennyezett állati eredetű termékek az élelmiszerláncon keresztül ugyancsak veszélyforrást jelenthetnek a fogyasztóra. Egy másik veszélyes útvonalat képez az úgynevezett „horizontális géntranszfer” is, mely során a mezőgazdaságból származó rezisztens gének a humán kórokozó baktériumokban is megjelennek (CHANG és mtsai, 2015).

A baromfiágazatban előforduló, rezisztens mikrobák által okozott problémák korábbi tanulmányok alapján konkrét példákkal szemléltethetők. BARTHOLOMEW és mtsai (2003) fluoroquinolone-rezisztens *Campylobacter* által szennyezett csirkehúsról számoltak be. Bizonyos rezisztens zoonózis-kórokozók, mint a *Salmonella* és a *Campylobacter*, klinikai fertőzéseket okoztak és a humán populációban ugyancsak elterjedt a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* is (CHANG és mtsai, 2015). WANG és mtsai (2012) a carbapenem-rezisztens *Enterobacteriaceae* családban

megtalálható, könnyen terjedő, rezisztens (NDM) gén eredendőjeként szintén a csirkehúst jelölték meg (CHANG és mtsai, 2015).

Az intenzív, iparszerű haltermelési rendszerek kialakulása ugyancsak a bakteriális eredetű fertőzések kitörését segítette (DEFOIRDT és mtsai, 2011). A baktériumok okozta fertőzések kialakulásának megelőzésére vagy gyógyítására a halaknál is állatgyógyászati készítmények használatosak (CHEN és mtsai, 2015). Az antimikrobás szerekre rezisztens patogének megjelenése a halágazatban ugyancsak kritikus probléma, hiszen nagy kockázatot jelent a rezisztens kórokozó akvatikus környezetből a humán populációba történő transzmissziója (PANDIYAN és mtsai, 2013). Az antibiotikumok alkalmazása további rizikófaktort jelent a vízi élőlények szempontjából, miután a gasztrointesztinális rendszer hasznos mikrobáit is elpusztítják. Nem utolsósorban, a halakból készített termékekben a mikrobiális szerek akumulálódhatnak, mely a fogyasztó egészségi állapotának károsodását eredményezheti (DENEV, 2008).

### **3.2 Természetes hatóanyagok, mint lehetséges alternatívák**

Napjainkban egyre több vizsgálat irányul a természetes eredetű hatóanyagok alkalmazására – mint potenciális immunmodulátorokra – annak érdekében, hogy csökkenteni vagy helyettesíteni tudjuk a felhasznált antimikrobás szerek mennyiségét (ZHANG és mtsai, 2013; WU és mtsai, 2017; MARKAZI és mtsai, 2017). Ilyen természetes hatóanyagok lehetnek az antioxidánsok; a gombákból és növényekből származó, immunstimuláns hatású kivonatok; valamint a pro- és prebiotikumok.

Az antioxidánsok megfelelő egészségi állapotot biztosítanak a szervezetnek az oxidatív stressz csökkentése és az immunfunkciók fejlesztése révén (CATONI és mtsai, 2008). Míg az akut stresszhatás a gyulladáskeltő folyamatokat súlyosbíthatja, addig a krónikus stressz az immunválasz szupresszióját is okozhatja (DHABHAR, 2009). Ezen folyamatok enyhítésére a legfontosabb antioxidánsok a C- és az *E-vitaminok*, melyek közül a C-vitamin a brojlerek humorális immunválaszát is képes fejleszteni (ATTIA és mtsai, 2009), az E-vitamin pedig a reaktív oxigén intermedierek megkötésével, továbbá az immunválaszban szerepet játszó gének szintézisének fokozásával gyakorolnak pozitív hatást a madarak immunitására (NIU és mtsai, 2009; JANG és mtsai, 2014). Az antioxidáns hatású vegyületek közül fontos

továbbá az *alfa-liponsav* is, melynek gyulladáscsökkentő szerepe van és képes csökkenteni a gyulladáskeltő citokinek mRNS szintjét a brojlerecsirkénél (EL-SENOUSEY és mtsai, 2018). A mikroelemek közül antioxidáns hatású takarmánykiegészítők a *cink* és a *szelén*, melyek az antitestek termelődését képesek fokozni, ezáltal a humorális immunválaszban van fontos szerepük (AKHAVAN-SALAMAT és mtsai, 2018; BAKHSHALINEJAD és mtsai, 2018; MA és mtsai, 2019).

Az antimikrobás szerek természetes alternatíváihoz tartoznak a különféle gombából származó vagy növényi eredetű, immunmoduláns hatású kivonatok, melyek az immunrendszer különféle funkcióira gyakorolt kedvező hatásukkal járulnak a megfelelő védekezőképesség kialakulásához (KOVÁCS, 2011). Ide sorolható például az élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) sejtfalából származó  $\beta$ -glükán, melyet a baromfiiparban gyakran alkalmaznak a humorális és celluláris (sejtes) immunválasz fokozása, valamint a védekezőképesség erősítése érdekében (SHAO és mtsai, 2016). Az akvakultúrában a *Chaga*, a *feketepata*, a *laska* és a *shiitake* gombából származó kivonatokot alkalmaznak, ami poliszacharidokban és más természetes bioaktív anyagokban, mint például  $\alpha$ - és  $\beta$ -glükánban, mannánokban, xilánokban és galaktánokban gazdag (ZOU és mtsai, 2016). Ezek a kivonatok antivirális, valamint immunstimuláns hatással bírnak (AIDA és mtsai, 2009).

A felhasznált növényi eredetű kivonatok lehetnek *zöldtea*, *szőlőmag*, *szőlőtörköly*, és *áfonya* kivonatok, melyek értékes *polifenolokat* tartalmaznak (FARAHAT és mtsai, 2016; EL-KELAWY és mtsai, 2018; EBRAHIMZADEH és mtsai, 2018; DAS és mtsai, 2020a). A polifenolok képesek lehetnek a gyulladáskeltő citokinek szintjének csökkentésére, azáltal, hogy fokozzák a gyulladáscsökkentő citokinek termelődését (JOSEPH és mtsai, 2016). Ugyancsak ide sorolhatók a *citrusféléből*, a *bogyósokból* vagy a *bambuszlevélből* előállított extraktumok is, melyek bioaktív hatóanyaga a *flavonoidok*, melyek bizonyos immunoglobulinok (IgG, IgM) termelődését fokozzák, ezáltal a brojlerek humorális immunválaszát serkentik (POURHOSSEIN és mtsai, 2015; DAS és mtsai, 2020b; SHU és mtsai, 2020). A lehetséges immunstimuláns hatással rendelkező növényi eredetű komponensekhez tartoznak a *karotinoidok* is, melyek közül az *asztaxantin*, a *xantofill*, a *lutein*, a *kurkumin* és a  $\beta$ -*karotin* gyulladáscsökkentő szerepük miatt gyakorta alkalmazott takarmánykiegészítők (LEE és mtsai, 2003; GAO és mtsai, 2012; KOUTSOS és mtsai, 2006; SELVARAJ és mtsai, 2006; GONG és mtsai, 2020).

A *karotinoidok*, mint például a  $\beta$ -*karotin* vagy az *asztaxantin* a halaknál is potenciális immunmodulátorok, miután képesek mind a sejtes, mind a humorális immunválasz szabályozására, ideértve többek között a fagocitózist, a szérumlizozim-aktivitást, a nemspecifikus citotoxicitást (AMAR és mtsai, 2004; TACHIBANA és mtsai, 1997; TORRISSEN, 1984; AMAR és mtsai, 2000; AMAR és mtsai, 2001). A növényi kivonatok közül kiemelendő a *szederkivonat* is, ami *antocianinokban* gazdag és képes növelni a halak lizozim aktivitását, a fagocitikus aktivitást, az immunválaszban résztvevő gének expresszióját és a teljes immunoglobulin szintet (YILMAZ, 2019b). Az akvakultúrában *algából* származó kivonatok is alkalmaznak, használatos például az *enyves kuszagyűszű gyökérkivonat*, az *astralagus gyökérkivonat*, melyek többek között a fagocitikus aktivitást és a lizozimaktivitást képesek növelni (VALLEJOS-VIDAL és mtsai, 2016; WANG és mtsai, 2015; YIN és mtsai, 2009), valamint a *spirulina alga*, mely szintén fokozza a halak immunitását (PROMYA és CHITMANAT, 2011).

A természetes alternatívákhoz sorolhatók a *probiotikumok* és *prebiotikumok*, melyek közül a probiotikumok olyan élő mikroorganizmusok összessége, amelyek megfelelő mennyiségben történő biztosítása jó egészségi állapotot kölcsönöz a gazdaszervezetnek. A prebiotikumok olyan emészthetetlen oligoszacharidok mixtúráját jelentik, melyek támogatják a bélben található probiotikus mikroorganizmusok növekedését, tevékenységét (REZAEI és mtsai, 2015). A prebiotikumokhoz tartoznak a *frukto-oligoszacharidok*, a *mannán-oligoszacharidok* vagy a *galakto-oligoszacharidok*, mely oligoszacharidokat a vastagbél hasznos baktériumai fermentálják (GOMES és MALCATA, 1999). A belekben zajló fermentáció, illetve annak megváltozott mikrobiotája befolyásolhatja az immunrendszer működését, így a prebiotikus hatás az immunrendszer működésével szoros összhangban van (BABU és mtsai, 2012). A prebiotikumok közül a *mannán-oligoszacharidok* és *frukto-oligoszacharidok* szintén elterjedt alternatívák a halaknál is, miután képesek a humorális immunitás, mint például a lizozimaktivitás javítására (HOSEINIFAR és mtsai, 2015). A *probiotikumok* az immunsejtekkel (monocitákkal, makrofágokkal, neutrofilekkel, természetes ölüsejtekkel) működnek együtt, valamint növelni tudják a halak immunoglobulin szintjét (IRIANTO és AUSTIN, 2002; AL-DOHAIL és mtsai, 2009).

### 3.3 A kutatásban alkalmazott bioaktív növényi hatóanyagok

#### $\beta$ -glükán

A bioaktív hatóanyagok közül az élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) sejtfalából származó  $\beta$ -glükán kivonat immunstimuláló hatása bizonyított (NOVAK és VETVICKA, 2008). A sejtes és humorális immunválasz fokozásának, valamint a védekezőképesség erősítésének céljából a baromfiiparban széleskörben alkalmazott kivonat (SHAO és mtsai, 2016). Korábbi tanulmányok szerint képes csökkenteni az *Eimeriák* okozta fertőzés súlyosságát (COX és mtsai, 2010a), bakteriális fertőzést követően fokozza a makrofágok fagocitózisát (CHEN és mtsai, 2008), emellett a madarak termelését is pozitívan befolyásolja (CHO és mtsai, 2013). *Salmonella enteritidis* sejtfalából származó lipopoliszachariddal (LPS) immunizált csirkékénél a  $\beta$ -glükán csökkentette a *TNF- $\alpha$*  proinflammatorikus (gyulladásokeltő) citokin génexpressziós szintjét, ezáltal fokozta a madarak immunválaszát (VETVICKA és OLIVEIRA, 2014). COX és mtsai (2010b) tyúkoknál az *IL-8* és *IL-18* gyulladásokeltő citokinek csökkenő génexpressziójáról számoltak be, melyet a szerzők a  $\beta$ -glükán gyulladásos immunválaszban betöltött kedvező szerepével magyaráztak. Az élesztősejtfal-kivonat pozitív hatást gyakorolt továbbá pulykák vakbelének mikrobiotájára is, miután növelte a hasznos baktériumok (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*) populációját. Emelkedett továbbá a gyulladáscsökkentő *IL-10* és csökkent a gyulladásokeltő *IL-1* citokinek génexpressziója a madaraknál, melyet a szerzők az intesztinális mikrobiotában bekövetkező előnyös változásokkal hoztak összefüggésbe (SHANMUGASUNDARAM és mtsai, 2014).

#### Karotinoidok

A karotinoidok izoprénvázas, zsírban oldódó szerves vegyületek, pigmentek (GOODWIN, 1986). Magasabb rendű növények lipidjeiben oldódva sárga, narancssárga, vöröses, valamint ibolyás színeket mutatnak. A karotinoid színezékek általában 40 szénatomosak, konjugált kettős kötéssel és transz konfigurációval rendelkeznek. Megkülönböztetünk karotinoid-szénhidrogéneket, melyek közül a legfontosabbak a likopin és az  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -karotinok. Az oxigéntartalmú karotinoidokhoz,

másként xantofillokhoz tartozik többek között a *kriptoxantin*, a *zeaxantin*, a *lutein*, a *kapszantin* és az *asztaxantin* (CSAPÓ és CSAPÓNÉ, 2003). A madaraknál és a halaknál a karotinoidokon alapul a bőr, a tollak, a tojássárgája és egyéb szövetek pigmentációja. A baromfiipar és az akvakultúra is előszeretettel alkalmazza takarmánykiegészítőként a *kanthaxantint* és a *luteint*, hogy biztosítsák az állati eredetű termékek megfelelő pigmentáltságát (KOUTSOS és mtsai, 2003). A karotinoidok antioxidáns és immunmoduláló hatással bírnak (GOODWIN, 1986). Egyes karotinoidok, mint például az *asztaxantin*, gyulladáscsökkentő hatással rendelkezhet, miután lipopoliszachariddal immunizált egereknél gátolta a *TNF- $\alpha$*  és *IL-1 $\beta$*  gyulladáskeltő citokinek termelődését (LEE és mtsai, 2003). A xantofillok ugyancsak proinflammatorikus citokinek (*IL-1 $\beta$*  és *IL-6*) génexpressziójának csökkenését eredményezték tyúkknál (GAO és mtsai, 2012). A *lutein* és *kurkumin* (xantofill karotinoidok) LPS-injektált pulykáknál fokozta a gyulladáscsökkentő immunválaszt (SHANMUGASUNDARAM és SELVARAJ, 2011). A kurkumin az intesztinális morfológiára és az emésztésre is pozitív hatást gyakorolt csirkéknél (RAJPUT és mtsai, 2013).

A karotinoidokról a halaknál ugyancsak a sejtes és humorális immunitás – mint például a fagocitózis, nemspecifikus citotoxicitás, szérumlizozim-aktivitás – potenciális regulátoraként számoltak be (AMAR és mtsai, 2004; TACHIBANA és mtsai, 1997; TORRISEN, 1984; AMAR és mtsai, 2000; AMAR és mtsai, 2001; YANAR és mtsai, 2007). Az *asztaxantin* gyulladáscsökkentő szerepét az északi kígyófejnél (*Channa argus*) is megfigyelték, miután az LPS-stimulált halaknál gátolta az *IL-1 $\beta$* , az *IL-6* és a *TNF- $\alpha$*  mRNS expresszióját (LI és mtsai, 2019).

### **Oligoszacharidok (prebiotikumok)**

Az oligoszacharidok a zöldségek és növények természetes komponensei. A legtöbb oligoszacharid, mint például a frukto-oligoszacharid, a mannán-oligoszacharid vagy a galakto-oligoszacharid a monogasztrikus állatok vékonybelében nem emészthető, ezáltal a vastagbél hasznos mikroorganizmusai fermentálják (GOMES és MALCATA, 1999). Ebből adódóan, ezeket az oligoszacharidokat számos esetben alkalmazzák prebiotikumként, az antibiotikumok természetes alternatíváiként, melyek stimulálhatják a brojlercsirkék immunrendszerének működését (CROSS és mtsai, 2007;

YANG és mtsai, 2008; SHASHIDHARA és DEVEGOWDA, 2003; GUO és mtsai, 2004). Néhány oligoszacharid, mint például a mannán- és galakto-oligoszacharid a brojlerek intesztinális struktúráját is fejlesztette (JI és mtsai, 2001; XU és mtsai, 2003; SHANG és mtsai, 2015).

A halaknál az oligoszacharidok közül az inulint, a frukto-, mannán- és galakto-oligoszacharidokat ugyancsak alkalmazzák takarmánykiegészítőként, miután képes fokozni a specifikus immunitást (DAS és mtsai, 2017), valamint pozitívan befolyásolhatja a mikrobiota alakulását is, amely ugyancsak előnyös hatással lehet az immunstátuszra (BAILEY és mtsai, 1991).

### **Antocianinok**

Az antocianinok a flavonoidokhoz tartozó színanyagok. A flavonoidok a másodlagos polifenolok egy csoportját képezik és a növényvilág jellemző alkotói. A virágok, gyümölcsök színét elsősorban az antocianinok és glikozidjaik adják. (JENKINS, 1992; ANTUS és MÁTYUS, 2014). Az antocianinok főként bogyós gyümölcsökben fordulnak elő és a pirosas, lilás, kékes színek termeléséért felelnek (TULIO és mtsai, 2008). Napjainkban az antocianinokat szintén használják takarmánykiegészítőként, lehetséges antioxidáns, gyulladáscsökkentő és immunstimuláló hatásuk miatt, ám hatásuk a madaraknál még kevésbé ismert (CHANGXING és mtsai, 2018). Néhány korábbi tanulmány szerint az antocianinban gazdag fragmentek gátolták a gyulladáskeltő citokinek ( $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ) expresszióját egerekben (LI és mtsai, 2014).

Halakon végzett tanulmányok alapján az antocianinok képesek bizonyos immunológiai paraméterek, mint például a fagocitikus aktivitás, fagocitikus index, lizozimaktivitás, mieloperoxidáz-aktivitás és a teljes immunoglobulinszint növelésére (YILMAZ, 2019a; YILMAZ, 2019b), továbbá bizonyos citokinek ( $IL-1\beta$ ,  $IL-8$ ,  $TNF-\alpha$ ,  $IFN-\gamma$ ) génexpresszióját is megváltoztatják (YILMAZ, 2019a).

## 3.4 A madarak immunrendszerének felépítése

### 3.4.1 A madarak immunszervei

A madár-immunológia fejlődésének egyik legjelentősebb mérföldkövét képezte az adaptív immunrendszer két fő ágának meghatározása. A limfociták szerepének fontossága körülbelül az 1960-as években értékelődött fel és ezzel egy időben általánosan is elfogadottá vált, hogy a szerzett immunválasznak két típusa létezik: az antitesteket magában foglaló humorális immunválasz, valamint a limfociták és makrofágok által közvetített sejtes immunválasz. Mivel az antitesteket plazmasejtek termelik, melyek maguk is limfocitákból származnak, nem volt egyértelmű, hogy ezek a limfociták hogyan különbözhetnek azoktól, melyek a sejtes immunválasz részét képezik. E probléma feltárásában egy zsákszerű szerkezetnek, a Fabricius-tömlőnek volt döntő szerepe. A limfomyeloid szövetek eredete lehet epiteliális (hámszövet eredetű), mint a Fabricius-féle tasak és a timusz, valamint mezenchimális, úgy, mint a lép, a nyirokcsomók vagy a csontvelő (DAVISON, 2008).

#### **Fabricius-tömlő (*Bursa Fabricii*)**

A Fabricius-tömlő a kloáka *proctodeum* (kettős záróizommal rendelkező, külvilággal kapcsolatban álló nyílás) részéhez kapcsolódó hámszövet-kinövés, mely zsákszerű szerkezetű és a bél hátsó részén megtalálható szerv (SHARMA, 1991; DAVISON, 2008; DUBLECZ és mtsai, 2011). Elnevezése Hieronymus Fabricius után történt. A Fabricius-féle tasak elsődleges és egyben egyedi immunszervként szolgál, mely kizárólag a madaraknál található meg. A szerv szabályozása alatt áll a humorális immunitáshoz tartozó, B-limfociták által szekretált antitestek termelődésének folyamata (SHARMA, 1991). A B-limfocitákat elsőként csirkében azonosították, amikor a Fabricius-tömlő újszülött korban történő műtéti eltávolítását követően a madarak szervezete képtelen volt ellenanyagot termelni *Salmonella typhimurium* „O” antigének ellen (GLICK és mtsai, 1956). Immunokémiaileg és genetikailag az immunoglobulinok három osztályát különböztetjük meg a csirkénél, melyek homológjai az emlős IgM-, IgA- és IgG-nek. Az immunoglobulinok közül az IgM a B-limfociták felszínén expresszálódik és elsőként termelődik az antitest-immunválasz

során, míg az IgG a másodlagos antitest-válasz során képződik és madaraknál gyakran IgY-nak is nevezik (RATCLIFFE, 2006).

## **Timusz**

A celluláris immunrendszer működését a csecsemőmirigy vagy timusz szabályozza. A csecsemőmirigy szintén elsődleges nyirokszerv a madaraknál, mely a garattasak hámszövetének kinövéséből ered még a korai embrionális szakaszból (SHARMA, 1991). A timusz párhuzamosan fekszik a nyaki vénákkal, körülbelül 7-8 lebenyből áll, melyek gomb, vagy bab alakúak és a nyak mindkét oldalán megtalálhatóak (OLÁH és VERVELDE, 2008). A timusz felelős a sejtes immunrendszer fő sejtjeinek, a T-limfociták éréséért (SHARMA, 1991). A gerinceseknél a T-sejtek repertoárjának kialakulása és a központi tolerancia a timuszban jelenik meg. A T-sejtek fejlődését a T-sejt prekurzorok és a timusz egyéb rezidens sejtjeinek (epitélsejtek, makrofágok, dendritikus sejtek) összehangolt működése segíti (EVOLI és MEACCI, 2019). A timusz epitélsejtek fő forrásai a citokineknek, melyeknek szerepe van a T-sejtek differenciálódásában. A timusz sejtek hatására többek között citokinek, hormonok szabadulnak fel, melyeknek szerepe van az immunválasz modulálásában (YAN és mtsai, 2017). A sejtes immunrendszer további fontos sejtjei még a természetes ölósejtek (Natural Killer sejtek – NK sejtek) és az effektor sejtek is (SHARMA, 1991).

## **Lép**

A lép a másodlagos nyirokszervekhez tartozik, amely nélkülözhetetlen mikrokörnyezetet biztosít a limfoid és nem limfoid sejtek közötti kölcsönhatáshoz (SHARMA, 1991; OLÁH és VERVELDE, 2008). A csirkék lépe formáját tekintve kör vagy ovális alakú és a mirigyos gyomor bal oldalán fekszik. Funkciója a madaraknál a teljes immunműködés során sokkal kiemelkedőbb, mint például az emlősöknél, miután a szárnyasoknál a nyirokerekek és a nyirokcsomók gyengén fejlettek (OLÁH és VERVELDE, 2008). Ezáltal a lép elsődleges szerv, melynél az immunválasz megindul az immunrendszer által felismert antigének ellen (VAN ROOIJEN, 1990). A lép szövetei a vörös és fehér lép. A vörös lépben eritrociták, granulociták, makrofágok, elvértve T-limfociták és plazmasejtek vannak. A plazmasejtek által termelt antitestek

a szérumon keresztül áramlanak a szervezetben. A fehér pép morfológiailag 2 részre osztható: a peri-arterioláris limfoid hüvelyre (PALS) és peri-ellipszoidális limfoid hüvelyre (PWP). A PALS a T-limfociták sűrű hüvelye, míg a PWP-ben B-limfociták vannak. Az antigén-specifikus, antitest előállító sejtek kezdetben a PALS-ban, később már a vörös pépben vannak jelen (JEURISSEN, 1991; OLÁH és VERVELDE, 2008).

### **Emésztőrendszerhez kapcsolódó limfoid szövetek – GALT (Gut-Associated Lymphoid Tissue)**

Habár a csirkéknél hiányoznak a kapszula-szerű nyirokcsomók, ehelyett azonban fejlett limfoid szövetekkel rendelkeznek. Miután a bélnyálkahártya az antigének elsődleges célpontja, a csirkéknél kifejlett, bélnyálkahártyához kapcsolódó limfoid szövetekről beszélhetünk. Ezek a teljes béltraktus mentén megjelenő, egyedülálló vagy aggregált limfoid csomók/tüszők lehetnek. A Fabricius-tömlő mellett a GALT-hoz soroljuk a vakbélmandulákat, a Peyer-plakkokat, a Meckel-féle divertikulumot és a garat manduláit (OLÁH és VERVELDE, 2008).

### **Harderian- és kötőhártyához kapcsolódó limfoid szövetek – HALT (Harderian and Conjunctiva-Associated Lymphoid Tissue)**

A fő, szemhez kötődő limfoid szövetek a Harderian mirigyben és az alsó szemhéj kötőszövetében található, de limfociták és plazmasejtek szétszórtnak a lacrimál mirigyben és a szem körüli egyéb kötőszövetekben is található. A Harderian mirigy ektodermális eredetű, exokrin mirigy, mely a szem mögött található. A mirigy „fej” részében T-sejtek és makrofágok, a mirigy-testben számos B-limfocita és plazmasejt található. Az egyed fejlődési állapotától függően B- és T-limfociták csoportosulása található a mirigy bizonyos részein (OLÁH és VERVELDE, 2008).

#### **3.4.2 A madarak veleszületett immunitása**

A madarak immunitása veleszületett (nemspecifikus) és szerzett (specifikus) immunitásra tagolható. Habár a veleszületett immunválasz egyes kórokozók

szemben nonspecifikus, a patogének bizonyos csoportjai ellen a veleszületett immunválasz is specifikus, továbbá a szerzett immunválasz kialakulásához vezet. A veleszületett immunitás saját receptorokkal rendelkezik, ide tartoznak a mintázatfelismerő receptorok (PRRs – Pattern Recognition Receptors) és az effektor sejtek (heterofilek, NK sejtek és dendritikus sejtek), melyek citokineket és kemokineket termelnek. Ezek a molekulák vesznek részt a gyulladási immunválasz kialakulásában, az akutfázis reakciókban, valamint antigénprezentáló sejtek segítségével jelzik a patogéneket, antigéneket az adaptív immunválasz irányába a fő hisztokompatibilitási komplex (MHC – Major Histocompatibility Complex) közreműködésével (KAISER, 2010).

### **A mintázatfelismerő receptorok (PRR-ek, Pattern Recognition Receptors)**

A PRR-ek felismerik mind az exogén, mind az endogén antigéneket, továbbá azonosítják a patogénekre jellemző molekuláris mintázatot (Pathogen-Associated Molecular Patterns – PAMPs). A PAMPs olyan molekulák összessége, melyek a patogének felszínén találhatóak, mint például a lipopoliszacharid (LPS), a flagellin, a peptidoglikán, vagy a különféle patogén nukleinsavak (RNS, DNS). Funkciójukat tekintve szignál és endocita PRR-eket, elhelyezkedésüket tekintve membránhoz kapcsolódó és citoplazmikus PRR-eket különböztetünk meg (KAISER, 2010).

A legjobban karakterizált membránhoz kapcsolódó PRR-ek a toll-like receptorok családja (TLR-ek). A specifikus PAMP felismerését követően a TLR-ek aktivációja számos szignálút vonal indukálásához vezet, melyek a nukleáris faktor-kappa B (NF- $\kappa$ B) út vonal, a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) út vonal és az I-es típusú interferon (IFN) út vonal, ami további proinflammatorikus citokinek, kemokinek és I-es típusú IFN-ok termelődéséhez vezet (KAISER, 2010). A toll-like receptorok I-es típusú transzmembrán fehérjék (AKIRA és mtsai, 2001). A sejt felületen lévő PAMP-ot felismerő TLR-ek közül a tyúk esetén bizonyosan a TLR-4 és TLR-5 ortológ ismert (LEVEQUE és mtsai, 2003; IQBAL és mtsai, 2005). A TLR-4 érzékeli a Gram-negatív baktériumok sejt falában megtalálható lipopoliszacharidot, míg a TLR-5 azonosítja a bakteriális flagellin fehérjét, mely a baktérium flagellum alkotója (KEESTRA és mtsai, 2007; HAYASHI és mtsai, 2001). A bakteriális TLR-agonisták (lipopoliszacharid, flagellin) fokozzák más gyulladáskeltő citokinek, mint például az IL-1 $\beta$  és az IL-6 expresszióját (KOGUT és mtsai, 2005).

A csirkéknél specifikus toll-like receptorok még a TLR-15 és TLR-21, a citoplazmikus PRR-ek közül legismertebbek a NOD-szerű receptorok (NLR-ek), melyek további gyulladáskeltő citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-18) termelését idézik elő. A citoplazmikus PRR-ek a vírusok egyszálú vagy duplaszálú RNS-ét, az endocita PRR-ek pedig a patogén felületén lévő szénhidrátokat azonosítják (KAISER, 2010).

### **Defenzinek**

A defenzinek kicsi, kationos, antimikrobás peptidek, melyek a madarakon kívül megtalálhatók emlősökben, rovarokban és a növényekben is. Funkciójukat tekintve a mikroba sejtmembránjához kapcsolódnak és bennük pórusokat formálnak, mely a mikrobasejt pusztulásához vezet, vagy továbbítják a makrofágok felé, ami segíti a mikroba megsemmisítését (SORURI és mtsai, 2007). A madaraknál az  $\alpha$ - és  $\beta$ -defenzinek közül az utóbbi van jelen, ami elsősorban a leukocitákban vagy epitélsejtekben expresszálódik (LYNN és mtsai, 2007).

### **Heterofilek**

A heterofilek (emlősökben neutrofilek) polimorfonukleáris sejtek, amelyek fagocitózis által védekeznek a patogének ellen. A heterofilek az indukált veleszületett immunválasz fő effektor sejtjei, az első molekulák egyike, melyek – válaszként a kemokinek felszabadulására – reagálnak a fertőzés kialakulásának helyén. Miután a kórokozókat bekebelezik, létrejön a fagoszóma és számos mechanizmuson keresztül pusztítják el azokat (KAISER, 2010).

### **Dendritikus sejtek**

A dendritikus sejtek szerepe a T-sejtek aktiválásában van és úgynevezett „professzionális” antigénprezentáló sejttekként (APC) ismertek. Az antigén befogását követően érésük a nyirokcsomókban történik az emlősöknél. Miután a tyúkoknál a nyirokcsomók hiányoznak, a dendritikus sejtek által végzett antigénprezentálás a szerzett immunválasz irányába még kevésbé ismert (KAISER, 2010). Szerepük van a nemspecifikus immunitás más immunsejtjeivel, mint például az NK sejtekkel való közreműködésben (ANDREWS és mtsai, 2005).

### 3.4.3 A madarak szerzett (specifikus) immunitása

Habár a védekezés során néhány esetben elegendő a veleszületett immunválasz kialakulása is, általánosan a szerzett immunitás feladata a szervezet patogénektől való megszabadítása, továbbá ez vezet az immunológiai memória kialakulásához akár az elsődleges fertőzés, akár a vakcinákra adott válasz eredményeként. Az adaptív immunitás kétféle – intracelluláris vagy extracelluláris patogének eliminálását igénylő – immunválaszra osztható. Előbbihez tartoznak a vírusok, az intracelluláris baktériumok és protozoonok, melyek ellen a sejtek által szabályozott, sejtes adaptív immunválasz nyújt védelmet. Ezeket nevezhetjük inflammatorikus, gyulladós válasznak is. Az extracelluláris baktériumok, protozoonok, férgek esetén a humorális adaptív immunválasz aktiválódik, melyben az eozinofileknek és antitesteknek van szerepe. A sejtes és humorális adaptív immunválasz szabályozását részben két citokin-alcsalád befolyásolja: Th1 és Th2 (T helper) sejtek (KAISER, 2010).

#### Citokinek

A veleszületett és a szerzett immunitás részeként a citokinek extracelluláris szignálként működnek a sejtek között az immunválasz kialakulása során (KAISER és STÄHELI, 2008). Szerepük elengedhetetlen az információ továbbításának, a gyulladós reakciók és az immunválasz kialakulásának szempontjából. A citokinek a sejteken található citokin receptorokhoz kapcsolódnak, így fejtik ki hatásukat, ami a sejtek aktivációját, proliferációját és differenciálódását idézi elő (ERDEI és mtsai, 2012).

Az interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) az interleukin-1 család tagja (KAISER és STÄHELI, 2008). A citokin szerepet játszik a gyulladós reakciók kialakulásában, valamint a makrofágok és T-sejtek aktiválásában (LOTZ és mtsai, 1988; KLASING, 1988; DIEHL és mtsai, 2000; CORWIN, 2000). Az IL-1 $\beta$  proinflammatorikus (gyulladáskeltő) citokin (DINARELLO, 2000) és jellemző az emelkedett IL-1 $\beta$  expresszió a szervezet bakteriális, virális vagy parazitás fertőzöttsége esetén (GIBSON és mtsai, 2014). Az IL-6 az IL-1 $\beta$ -hoz hasonlóan gyulladáskeltő citokin (KAMBAYASHI és mtsai, 1995), szerepe a limfociták aktiválódásának és differenciálódásának szabályozásában van. Th2, valamint B-sejtek állítják elő és a gyulladós reakciókban való részvétele miatt a natív immunválasz elengedhetetlen

molekulája. Szerepe van továbbá a B-limfociták effektor sejtekké valóérésében és az ellenanyagtermelésben is (ERDEI és mtsai, 2012). Felszaporodása akutfázis reakció kialakulásaként magyarázható (HONG és mtsai, 2006). Az interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) és az interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) az I-es típusú IFN családba sorolható, melyek közül az IFN- $\alpha$  antivirális funkcióval jellemezhető citokin (SEKELLICK és mtsai, 1994; SICK és mtsai, 1996). Az IFN- $\alpha$  a veleszületett immunitás egyik fő immunfaktora, emelkedett expressziója a gazdaszervezet virális fertőzöttségére utal. További olyan gének emelkedett expresszióját is eredményezi, melyek a virális fertőzés folyamán kialakuló immunválaszban vesznek részt (JIANG és mtsai, 2011). Az IFN- $\gamma$  a Th1 sejtek által előállított, proinflammatorikus citokin, ami a makrofágok stimulálásában vesz részt (GÖBEL és mtsai, 2003; WU és mtsai, 2017). Intracelluláris patogénekkal történő beoltást követően megfigyelték, hogy az immunválasz során az adott citokin dominált, így kulcsfontosságú a Th1 sejtek által szabályozott immunválaszban (KAISER és STÄHELI, 2008).

### **Immunoglobulinok**

Az immunoglobulinok olyan glikoproteinek, melyek antitest-aktivitással rendelkeznek. A gerinceseknél a vérben, a nyirokrendszerben, valamint a vaszkularizált szövetekben található (MARCHALONIS, 1977; LITMAN és mtsai, 1993). Struktúrájukat tekintve 4 polipeptidláncból épülnek fel, két nehéz (heavy – H) és két könnyű (light – L) láncból, melyek közösen alkotják a monomerikus egységet ( $H_2L_2$ ). A madár immunoglobulinok közül az immunoglobulin G (IgG) sokkal komplexebb molekula, mint az IgM vagy IgA és az említett alapegység sokszorosából épül fel. Filogenetikai tanulmányok szerint a madaraknál az alacsony molekulatömegű IgG homológ az emlős IgG-vel, továbbá hasonlóságokat mutat az emlős IgE-vel is, ezért a két emlős homológ között lehet elhelyezni. A madár IgG izotípus túlnyomóan a szérumban van jelen és az elsődleges antitest-válasz során, az IgM után termelődik, a másodlagos antitest-válasz során pedig fő izotípusnak tekinthető. Az IgG-t a szakirodalom madaraknál gyakran IgY-ként is emlegeti, miután biokémiai tulajdonságaiban eltér az emlős IgG-től (SURESH és mtsai, 1994).

A tyúkoknál az IgM mind strukturálisan, mind funkcióját tekintve megegyezik az emlős megfelelőjével. Az embrionális fejlődés során az IgM domináns B-sejt antigénreceptor és az első kifejeződő izotípus, továbbá a későbbi fejlődés során

megjelenő új antigéneknél is elsőként termelődő immunoglobulin. Bizonyos krónikus bakteriális fertőzések kialakulásánál az IgM jónéhány hétig képes aktív maradni (SURESH és mtsai, 1994).

A madarak IgA antitestje struktúrájában és funkciójában is homológ az emlősökével, ami tyúkoknál főként a különböző váladékokban, például az epében található (BIENENSTOCK és mtsai, 1972; LEBACQ-VERHEYDEN és mtsai, 1974; ORLANS és ROSE, 1972). A további antitestek (IgD és IgE) a madaraknál hiányoznak, miután az IgD helyett a madarak B-sejtjeiben nagyrészt IgM expresszálódik, az IgE-nek tulajdonított funkciókat pedig az IgG (IgY) látja el (DAVISON és mtsai, 2008).

### **3.5 A házityúk intesztinális mikrobiota-összetétele és az immunhomeosztázis kapcsolata**

Az endogén intesztinális mikrobiota a gasztrointesztinális traktusban élő mikrobák sokaságát jelenti, felépítése és funkciója döntő fontosságú a baromfi egészsége szempontjából (KOGUT, 2013). A mikrobiota fontos szereppel bír bizonyos fiziológiai folyamatokban, ideértve a tápanyagok hasznosulását, az anyagcsere-folyamatokat és az immunitást is. Az emésztési folyamat szorosan kapcsolódik a bélben kialakuló mikrobaközösséghez, ugyanis a tápanyagok hasznosulása, a takarmány emészthetősége, az energianyerés, mindezek által pedig a termelékenység a mikrobiom összetételétől és diverzitásától függ (STANLEY és mtsai, 2013; MANCABELLI és mtsai, 2016). A csirke béltraktusában kialakuló mikrobiota baktériumfajok százát tartalmazza, melyek közül a legtöbb a Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria és Actinobacteria törzsekhez sorolható (OAKLEY és mtsai, 2014; CLAVIJO – FLÓREZ, 2018). A mikrobaközösség a csirke béltraktusának különböző szakaszain eltér, így a vékonybélben jellemző a *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* és *Enterococcus* fajok jelenléte, míg a vakbélben főként anaerob, kisebb mértékben fakultatív anaerob baktériumok vannak jelen (DIAZ CARRASCO és mtsai, 2019; LU és mtsai, 2003). A mikrobapopuláció kialakulása az életkor előrehaladtával fokozatosan történik. Napos korban a bélflóra csíraszám alacsony, kezdetben számottevő az anaerob baktériumok megjelenése, melyet az anyától és a környezetből vesz fel a naposcsibe (MEAD és ADAMS, 1975). A második és negyedik napok között a vékonybélben és vakbélben megjelennek

a *Streptococcusok* és *Enterobacteriumok*. Az első hét elteltével a vékonybélben a *Lactobacillusok*, a vakbélben a fakultatív és obligát anaerobok (*Escherichia coli* és a *Bacteroides* fajok) dominálnak (LEV és BRIGGS, 1956; MEAD és ADAMS, 1975). Két hét múltán a vékonybél mikrobiota csaknem teljes, míg a vakbélben körülbelül 30 napig tart a mikrobaközösség kialakulása, mely időszakban már főként a *Bifidobacterium* és *Bacteroides* fajok jellemzőek (BARNES és mtsai, 1972).

A *Lactobacillusok* Gram-pozitív baktériumok és mindösszesen 140 faj alkotja a nemzetséget. Spórátlanok, alakjuk szerint gömb, pálcika vagy spirális alakúak. Antibiotikumok termelésére képesek (mint például Lactacin B, Helveticin J), továbbá szerves savakat állítanak elő, mely által csökken a béltraktus pH-értéke, ami gátló hatást fejt ki a kórokozók élettevékenységére. Egyéb előnyös mikrobák életfolyamatait serkenti, ezáltal a *Lactobacillus* fajok a probiotikumok jellemző mikrobái (HUYGHEBAERT és mtsai, 2011; GIBSON és ROBERFROID, 1995). A *Bifidobacteriumok* ugyancsak Gram-pozitívak és a mikrobiota hasznos baktériumai. A nemzetségre jellemző, hogy meghatározott szereppel bír a mikrobiota normál egyensúlyának fenntartásában, befolyásolja az immunválasz kialakulását és gátolja a patogének aktivitását (ROSSI és AMARETTI, 2010). A *Lactobacillusok* mellett a *Bifidobacteriumok* is a probiotikumok baktériumai (LEE és mtsai, 2010). A *Clostridiumok* Gram-pozitív, anaerob baktériumok és normál esetben kis mennyiségben előfordulnak a madár bélflórájában. Enterotoxin termelésre képes fajok, melyek közül a legismertebb kórokozó a *Clostridium perfringens* (BARNES és mtsai, 1972; HUTCHINSON és RIDDEL, 1990; ONDERKA és mtsai, 1990). Az *Escherichia coli* Gram-negatív, az Enterobacteriaceae családhoz tartozó baktérium, mely kis arányban szintén a normál mikrobiota alkotója (DOZOIS és mtsai, 2003; PUENTE és FINLAY, 2001). A mikrobiota tagjai közé sorolható patogének a *Salmonella* és a *Campylobacter*, melyek közül a *Salmonella* gyakorta előfordul a baromfinál, ezáltal az élelmiszerláncban is megjelenő kórokozó (AMIT-ROMACH és mtsai, 2004). A *Campylobacter* humán enteropatogén, mely gyakran származik a csirke béltraktusából és akut bakteriális fertőzést okoz (MORENO és mtsai, 2001).

A béltraktusban kialakuló mikrobiota fontos szerepet játszik a madarak immunológiai homeosztázisában. Ebből adódóan, az immunrendszer állapotában bekövetkező egyensúlyhiány az intesztinális mikrobiota egyensúlyhiányára vezethető vissza, ami a madarak egészségi állapotát is befolyásolja (DIAZ CARRASCO és mtsai, 2019). A gasztrointesztinális mikrobiota egyfajta fizikai gátat, „barrier-t” képez, mely

véd a fertőzések kialakulása ellen, gátolja a patogének megtapadását, kolonizációját és a bakteriocinek, valamint egyéb toxikus metabolitok termelődését. Emellett, az összetett poliszacharidok fermentálásával energiát biztosít a szervezetnek. A mikrobiota és a veleszületett immunrendszer közötti kezdeti interakció a későbbi B-sejtes vagy T-sejtes szerzett immunválaszt is megalapozza (PAN és YU, 2014). A béltraktusban bekövetkező fertőzéseket a szervezet immunrendszere érzékeli és a veleszületett, valamint a szerzett immunitást is magában foglaló, komplex, összekapcsolódó útvonalak rendszerén keresztül ad válaszreakciót. A béltraktus védekezési mechanizmusához tartoznak a béta-defenzinek, azok az antimikrobiális peptidek, melyek a béltraktus hámrétegének felszínén találhatóak és a veleszületett immunrendszer fontos részei (SHIMIZU és mtsai, 2008). Ezek a peptidek a szervezet lipopoliszachariddal történő fertőzésére termelődnek és magukban foglalják a toll-like receptorok (TLR-4) és az NF- $\kappa$ B transzkripciós faktorok kifejeződését (AKBARI és mtsai, 2008). Ezek az elsődleges válaszreakciók kapcsolódnak a madarak veleszületett immunrendszeréhez és megalapozzák a szerzett immunitás kialakulását (PAN és YU, 2014). A mikrobiotát alkotó baktériumközösségekben bekövetkező változások a citokinek génextpresszióját is érintik (CORTHAY, 2006). A Proteobacteria törzshöz számos patogén (*Campylobacter*, *Salmonella*) sorolható és a törzs tagjainak növekedésével a gyulladáskeltő citokin profil hozható összefüggésbe, míg a Firmicutes törzshöz tartozó baktériumok (*Lactobacillus*, *Clostridium*) számának növekedésével a gyulladáscsökkentő citokinek kifejeződése van összhangban (DIAZ CARRASCO és mtsai, 2019; DEÁK és mtsai, 2006). Példaként, az IL-4 és az IL-10 csökkent expresszióját többek között a *Salmonella* vagy *Campylobacter* kórokozók általi fertőzés is okozhatja (KUMAR és mtsai, 2018). Az IL-6 expressziója *Salmonella typhimurium* hatására emelkedhet (WITHANAGE és mtsai, 2005) és a Proteobaktériumokhoz tartozó *E. coli*, *Salmonella* és *Shigella* ugyancsak proinflammatorikus mechanizmusokat eredményeznek. A Firmicutes törzshöz tartozó *Faecalibacterium* negatívan korrelál a proinflammatorikus citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18) expressziójával, míg pozitív összefüggésben van az anti-inflammatorikus TGF- $\beta$ 4 (transzformáló növekedési faktor béta 4) citokin kifejeződésével. A Firmicutes törzsbe tartozó más baktériumok pozitívan korrelálnak a gyulladáskeltő citokinek expressziójával (OAKLEY – KOGUT, 2016).

## **3.6 A halak immunrendszerének felépítése**

### **3.6.1 A halak immunszervei**

A csontos halaknál a timusz, mint immunszerv elhelyezkedéséről és fejlődéséről elsőként Maurer számolt be 1886-ban. Mikroszkopikus megfigyelésre alapozva azt a hipotézist állította fel, miszerint különböző korú halaknál a timuszban megtalálható limfociták közvetlenül epitélsejtekből fejlődnek (MAURER, 1886). A csontos halaknál a timuszon kívül a lép, valamint a vese jelenik meg a legfontosabb immunszervek között (ZAPATA és mtsai, 2006).

#### **Timusz**

A halaknál a timusz két homogén lebenyből áll, melynek struktúrája kapszulaszerű (ELLIS, 2001; DAVIS és mtsai, 2002). A szerv fejlődésének ideje a csontos halfajoknál eltérő, melyben nagy szerepe van a hőmérséklet testsúlygyarapodásra gyakorolt hatásának. Szerkezetének differenciálódása a csontos halaknál ugyancsak változó, számos fajnál ugyanis nem lehet megfigyelni a kéreg és a medullarészek elkülönülését, mely a magasabb rendű gerincesekre jellemző (BOWDEN és mtsai, 2005). A timuszban mieloid sejtek és eozinofilek, továbbá bizonyos epitel góccok jelennek meg, melyeket Hassal-testeknek neveznek (ZAPATA és mtsai, 2006). A limfoid szerv legfontosabb szerepe a T-sejtek előállításában van (TREDE és mtsai, 2001). Itt csoportosulnak a makrofágok, melyek a T-sejtek kapszulán belüli proliferációját idézik elő (DAVIS és mtsai, 2002).

#### **Vese**

A csontos halak esetén a vese funkciója megegyezik a gerincesek csontvelőjének funkciójával és a vérképzés legfontosabb helyszíne (ZAPATA és mtsai, 2006). Szerkezetileg az elülső vese retikuláris rostok hálózatából áll, melyek a limfoid szövetet támogatják és elszórtan találhatóak a vérképző sejtek között. Az elülső vese fő sejtjei a makrofágok, amelyek melanomakrofág-központoknak nevezett struktúrákban aggregálódnak, valamint a limfoid sejtek, amelyek minden fejlődési

szakaszban megtalálhatók és többnyire Ig + sejtekként (B sejtek) vannak jelen (PRESS és mtsai, 1994). A retikuláris sejtek fontos szerepet játszanak a limfoid sejtek és a sinusoidok endotél sejtjeinek működéséhez szükséges kölcsönhatások biztosításában. Ez utóbbi rendszer a vérszűrés fő alkotóeleme, miután képes az endocitózis végrehajtására (DANNEVING és mtsai, 1994).

## Lép

Az immunszerv lépi ellipszoidok, MMC-k és nyirokszövetek összességéből áll (FERGUSON, 1989). Az ellipszoidok vastag falú kapillárisok, amelyek a lépben megnyílnak és a lép arterioláinak megoszlásából származnak. A falak mentén lévő sejtek aktívan részt vesznek az antigének makrofágok általi fagocitózisában. Az antitestek vagy metabolikus termékek az antigéneket hosszú ideig visszatartják, melynek fontos szerepe van az immunológiai memória kialakulásában (DOS SANTOS és mtsai, 2000; PETRIE-HANSON és AINSWORTH, 2000).

A halak immunrendszere – néhány különbséget leszámítva – fiziológiailag megegyezik a magasabb rendű gerincesekével. A magasabb rendű gerincesekkel ellentétben, a halak egészen a korai embrionális szakasztól szabadon élő organizmusok és a túlélésük a veleszületett immunitás függvénye (ROMBOUT és mtsai, 2005). Az immunrendszer nonspecifikus és specifikus immunitásra osztható, melyek közül az előbbinek alapvető szerepe van a halak védekezési mechanizmusában. A nonspecifikus immunválasznak kulcsfontosságú szerepe van a szerzett immunitás kialakulásában és a receptorfehérjék rendszerén keresztül biztosítja a homeosztázis fenntartását. Ezek a receptorfehérjék felismerik a PAMP-okat, mint például a poliszacharidokat, lipopoliszacharidokat, a peptidoglikán baktérium DNS-ét, a vírusok RNS-ét és az egyéb „idegen” molekulákat. Ez a folyamat a fizikai „barrierék” (korlátok, határok), valamint a sejtes és humorális immunválaszok függvénye, melyhez a következő immunológiai paraméterek tartoznak: növekedésgátlók, lítikus enzimek, a klasszikus komplementrendszer, az alternatív és lektin útvonalak, az agglutininek, antitestek, citokinek, kemokinek és az antibakteriális peptidok. A veleszületett immunrendszer paramétereit különböző belső és külső tényezők befolyásolhatják: a hőmérsékletváltozás, a különböző stresszfaktorok, valamint a sűrűség

immunszuppresszív hatású lehet, míg a különféle takarmánykiegészítők és immunstimulánsok fokozhatják a működését (MAGNADOTTIR, 2006; MAGNADOTTIR, 2010).

### **3.6.2 A halak nemspecifikus immunitása**

A halak veleszületett immunválasza a kórokozók elleni küzdelemben alapvető szerepet tölt be, míg a szerzett immunrendszer működése korlátozott, ami többek között a limitált számú antitesteknek, valamint a limfociták lassú proliferációs, érési és memória folyamatainak tulajdonítható (WHYTE, 2007). A veleszületett immunrendszer elemei az epitel/nyálkahártya „barrier”, valamint a celluláris és humorális komponensek (MAGNADOTTIR, 2006).

#### **A fizikai barrierék**

A fizikai barrierékhez a pikkelyeket, a bőr nyálkahártyarétegét és a kopolyút soroljuk, melyek az első akadályt jelentik a fertőzések kialakulása során (INGRAM, 1980; SHEPHARD, 1994; ELLIS, 2001). A nyálkahártya különféle lektineket, pentraxinokat, lizozimokat, komplement fehérjéket, antibakteriális peptideket és IgM-et tartalmaz, melyek a kórokozók bejutását gátolják (ALEXANDER és INGRAM, 1992; ROMBOUT és mtsai, 1993; ARANISHI és NAKANE, 1997; BOSHRA és mtsai, 2006; SAURABH és SAHOO, 2008). Az epidermisz szintén képes a különböző támadásokra reagálni (megvastagodás, celluláris hiperplázia), továbbá az integritás és az ozmotikus egyensúly fenntartásával ugyancsak gátló hatással bír az „idegen” anyagok bejutásával szemben (HIBIYA, 1994). A limfociták, makrofágok és eozinofilikus granuláris sejtek jelenléte szintén a védekező mechanizmus első vonalát képezi (SVEINBJORNSSON és mtsai, 1996; ELLIS, 2001; FISCHER és mtsai, 2006).

#### **A nemspecifikus celluláris citotoxicitás**

A nemspecifikus immunválaszt a citotoxikus sejtek hajtják végre. A magasabb rendű szervezeteknél ezek a sejtek az NK sejtek, míg a halaknál a citotoxikus sejtek kisebb, agranuláris limfociták, melyek a nyirokszövetekben, az elülső vesében és a lépben, ritkán a vérben találhatóak (EVANS és JASO-FRIEDMANN, 1992; SHEN és

mtsai, 2002). Szerepük a paraziták, valamint egyéb „idegen” célpontok eliminálásában van (HASEGAWA és mtsai, 1998).

Az antimikrobiális peptidok a csontos halak esetén a nyákban, a májban és a kopoltyú szövetében található, mely polipeptidok képesek a baktériumok falának lebontására és a szervezet vírusokkal szembeni védelmére (ELLIS, 2001; MAIER és mtsai, 2008; BIRKEMO és mtsai, 2003).

A halak fagocitózisa során a főbb sejtek a neutrofilek és makrofágok, mely sejtek főként reaktív oxigén gyökök termelésével távolítják el a baktériumokat (SECOMBES és FLETCHER, 1992; FISCHER és mtsai, 2006). A neutrofilek úgynevezett mieloperoxidázzal is rendelkeznek, melyek halid és hidrogén peroxid jelenléte mellett a baktérium sejtfa halogenizációjára képesek. Ezek a sejtek a lizoszómáikban lizozimot és más hidrolitikus enzimeket is tartalmaznak (FISCHER és mtsai, 2006). A makrofágok nitrogén-oxidot termelnek, ami szintén antibakteriális hatású (SECOMBES és FLETCHER; 1992).

A nemspecifikus immunrendszer része a komplementrendszer is, mely a csontos halaknál három részre, a klasszikus, az alternatív és a lektin útvonalakra bontható. A klasszikus útvonalat az antitestek sejt felszínhez való kötődése aktiválja (HOLLAND és LAMBRIS, 2002). Az alternatív útvonal antitestektől független, ezt az útvonalat az „idegen” mikroorganizmusok aktiválják. A lektin útvonal aktiválódását olyan fehérjekomplexek megkötése eredményezi, melyek a baktériumsejtekben található és mannózhhoz vagy mannánhoz kötődő lektint tartalmaznak (SAKAI, 2001).

## **Citokinek**

A halaknál a citokinek olyan kis fehérjék, melyeknek szerepe a sejtek közötti szignál folyamatokban, valamint a gazdaszervezet fertőzések elleni védelmében van (GOMEZ és BALCAZAR, 2008; KAISER és STÄHELI, 2008; GONZALEZ és mtsai, 2007). Funkciójukat tekintve képesek modulálni a veleszületett és szerzett immunválaszt, továbbá stimulálják a vérképzést is (GOMEZ és BALCAZAR, 2008). A citokinek különféle kemokineket, interferonokat, interleukineket, limfokineket és tumor nekrozis faktorokat foglalnak magukban (SECOMBES és mtsai, 2001). A halaknál a gyulladáskeltő citokinek közül az IL-1 $\beta$  és a TNF- $\alpha$  a legszéleskörűbben karakterizált citokinek (SAEIJ, 2003; SAVAN és mtsai, 2003). Az IL-1 $\beta$  és TNF- $\alpha$  multifunkcionális immunfaktorok, melyek a gyulladással állapot során befolyásolják

a gének expresszióját (SIGH és mtsai, 2004). Az immunválasz kialakulásának kezdeti fázisában vesznek részt, ugyanis szerepük a leukociták gyulladás helyszínére történő vonzásában van (HUISING és mtsai, 2003). Szignálként működnek a sejtek közötti interakciós folyamatokban, részt vesznek a gazdaszervezet védekező mechanizmusaiban és a gyulladás kialakulásában (BOUDJELLAB és mtsai, 2000). A TNF- $\alpha$ -t makrofágok szekretálják és fokozza a sejtek más celluláris immunfaktorokkal való együttműködését (DE és MUKHERJEE, 2009). Az IL-1 $\beta$ -nak a másodlagos citokinek termelődésében van szerepe (MARKUS és SUSETTA, 2011). Az IL-8 csoportosítása szerint úgynevezett „CXC” kemokin, ami egy bizonyos glutamát-leucin-arginin (ELR) „motívumot” tartalmaz a CXC szekvencia előtt és a neutrofilek vonzásában van szerepe (CHEN és mtsai, 2005). Az interferon szabályozó faktor-1 (interferon regulatory factor-1, IRF-1) az interferon szabályozó faktor család tagja, mely olyan transzkripció faktor család, aminek szerepe virális fertőzések során, vagy más sejttípusoknál kialakuló stresszfolyamatoknál van (TAMURA és mtsai, 2008; BARNES és mtsai, 2002). Az IRF-1 részt vesz olyan vírusok, mint a baromfipestis, a szívizomgyulladás és a Hepatitisz C elleni antivirális folyamatokban (WYLLIE és mtsai, 1980; FUJIMOTO és mtsai, 2000; KANAZAWA és mtsai, 2004).

### **Proteáz-inhibitorok**

A nonspecifikus immunrendszer alkotóihoz sorolhatók a proteáz-inhibitorok, melyek a szérumban és egyéb testnedvben találhatóak (BOWDEN és mtsai, 1997). Legfőbb szerepük a testfolyadék homeosztázisának fenntartásában van, valamint proteolitikus enzimek szekretálásával vesznek részt az akutfázis reakciókban és a patogének elleni védelemben (MAGNADOTTIR, 2010).

### **Lizozim**

A veleszületett immunválasz részeként a lizozim olyan bakteriolitikus enzim, mely a baktérium sejtfalban lévő peptidoglikán hidrolizálásával a sejtek lízisét eredményezi. Szerepe van a Gram-pozitív és Gram-negatív baktériumok elleni védelemben is (MAGNADOTTIR, 2006). A lizozim fő forrásai a makrofágok és a neutrofilek (SVEINBJORNSSON és mtsai, 1996).

## **Antitestek**

Az antitestek a veleszületett immunitás részeként is megjelennek. Az említett immunfaktorok a szérumban találhatóak és azonnali védelmet biztosítanak a baktériumok, vírusok ellen. A csontos halak számos antigén ellen specifikus IgM-típusú antitestek termelésére képesek (WHYTE, 2007).

## **Pentraxinok**

A nemspecifikus immunalkotókhoz tartoznak a pentraxinok is, melyek a C-reaktív fehérjék (CRP), valamint a szérum amyloid fehérjék és a testnedvekben vannak jelen (BAYNE és GERWICK, 2001; WU és mtsai, 2003). Ezen proteinek szintje megemelkedik szöveti sérülés, trauma, vagy fertőzés esetén és nagy szerepük van a komplementrendszer klasszikus útvonalának aktiválásában és az apoptotikus sejtek eltávolításában (COOK és mtsai, 2003; DE HAAS és mtsai, 2000). A transferrin olyan glikoprotein, mely magas vaskelátképző aktivitással rendelkezik és a legfőbb vasion transzportfehérje az állatoknál. Magasfokú genetikai polimorfizmusának köszönhetően több genotípusa létezik, melyeknek szerepe van a bakteriális eredetű fertőzések elleni rezisztencia kialakulásában (SUZUMOTO és mtsai, 1997).

### **3.6.3 A halak specifikus immunitása**

A specifikus (szerzett) immunválasz mechanizmusa specifikus sejtek, fehérjék, gének és biokémiai útvonalak komplex hálózata, olyan magas specifitású és affinitású effektor sejtekkel, antitestekkel, amelyek biztosítják a szervezet antigének elleni specifikus immunválaszát (URIBE és mtsai, 2011).

## **Antitestek**

A csontos halak esetén a domináns immunoglobulin az IgM osztályának tetramerje, ami 8 antigén-kombinációs hellyel rendelkezik, néhány hal szérumában azonban monomer IgM található (ACTON és mtsai, 1971; WILSON és WARR, 1992). Az IgM után a halakban azonosított második izotípus az IgD, mely a B-sejtekben

fejeződik ki (WILSON és mtsai, 1997). Az antitestek a bőrben, a béltraktusban, a kopoltyú nyálkahártyában, az epében és a plazmában találhatók (HATTEN és mtsai, 2001; ROMBOUT és mtsai, 1986; LUMSDEN és mtsai, 1993; JENKINS és mtsai, 1994), melyek közül a bőr és a kopoltyú immunválasza rendkívül fontos, miután a környezettel közvetlen kapcsolatban állnak (CAIN és mtsai, 2000).

### **Immunológiai memória**

A specifikus immunitáshoz tartozik az immunológiai memória kialakulása is. A memória a T-sejt-független antigének megjelenését követően azonnal kialakul, míg a T-sejt-függő antigének esetén a másodszori jelenlétüket követően jön létre. A folyamat során a nagy affinitású receptorokkal rendelkező B-sejtek B memória sejtekké szelektálódnak (MORRISON és NOWAK, 2002).

### **Celluláris citotoxicitás**

A szerzett immunitás fontos eleme a celluláris citotoxicitás, melynek során a halak leukocitái celluláris citotoxikus folyamatokat képesek generálni. Azok a sejtek, melyek ezekért a folyamatokért felelnek, nehezen azonosíthatók. Emlősökben a különböző vírusfertőzések elleni küzdelemben a CD8+ citotoxikus T-limfociták által produkált adaptív immunválasz meghatározó. Ezek a limfociták azonosítják és elpusztítják azokat a sejteket, melyek vírusos eredetű peptideket tartalmaznak (FISCHER és mtsai, 2006). Az adaptív immunitás során bizonyos citokinek is jelen vannak, mely citokinek a T helper sejtek aktivációját és differenciálódását idézik elő, valamint további citokínkészlet felszabadulását eredményezik (SECOMBES, 2008). A szerzett immunitás során többek között az I- és II-es típusú interferonok aktiválódnak és a Th1 sejtek differenciálódását idézik elő. A citokinek közül például IL-10 és TGF- $\beta$  is felszabadul, melyek a szabályozó T-sejtek effektor sejtjei (URIBE és mtsai, 2011).

## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1 A növényi kivonatok előállítása

#### 4.1.1 Karotinoidok

A karotinoidok (*1. kép*) kivonását magyar édes pirospaprika-őrleményből (1-5 g) végeztük. A paprikapor kimérésére triplikátumban került sor, majd a kinyeréshez oldószerként 50 ml diklóretán:aceton:metanol = 2:2:1 arányú oldatot használtuk. Ezt követően a keveréket 30 percig ultrahangos vízfürdőben tartottuk, majd szűrőpapír segítségével átszűrtük. A további tisztításhoz 0,22 µm-es PTFE szűrőpapíron is átszűrtük a mintát. Az átszűrt anyagot 40°C-on 0,2 bar nyomással bepárooltuk, majd HPLC (nagy teljesítményű folyadékkromatográfia) pigment reagensben (izopropanol:ACN:metanol = 55:35:10) oldottuk fel (NAGY és mtsai, 2017). A további elválasztást HPLC készülék Phenomenex Kinetex<sup>®</sup> oszlopán (2,6 µm, XB-C18, 100 Å, 100 x 4,6 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) végeztük 2 gradiens folyadék segítségével: A: 11% metanol, B: izopropanol:ACN:metanol = 55:35:10 V/V/V%. A gradiens elúciós lépések a következők voltak: 0–3 percig: A 100%; 15–20 percig A 20%; 25–45 percig B 100%; 48–50 percig A 100%. Az áramlási sebesség 0,6 ml/perc volt. A diódasoros detektálást (DAD – Diode-Array Detection) 460 és 350 nm-en végeztük. A minták injektálása 10 µl-es mennyiségekben történt. A HPLC profil alapján a legnagyobb területtel rendelkező karotinoid molekulákat az *1. táblázat* foglalja össze.



*1. kép: A karotinoidokban gazdag kivonat*

Az azonosított karotinoid komponensek neve és relatív terület-aránya

Retenció idő (perc)	Karotinoid molekula neve	Relatív terület-arány (%)
11,163	$\beta$ -karotin	9,965
16,054	cisz-kapszantin	10,743
17,17	kapszantin	10,854
18,462	zeaxantin	4,503

#### 4.1.2 Arabino-galaktóz tartalmú oligoszacharidok

Magyar édes pirospaprika ipari feldolgozása során keletkező melléktermékből magas arabino-galaktóz tartalmú oligoszacharidokat – mint természetes prebiotikumokat – vontunk ki (2. kép). Az oligoszacharidok kinyerése és az oligoszacharid komponensek meghatározása HP5890 gázkromatográf SP-2380 kapilláris oszlopával (30 m x 0,25 mm; 0,2  $\mu$ m) történt. A mintákat liofilizáltuk, majd az extraktumot triflourecetsav:ecetsav:víz = 5:75:20 arányú oldószerrel oldottuk. Az oligoszacharid komponensek meghatározása előtt azokat alditol-acetáttá redukáltuk, majd a cukrokat cukoralkohollá (alditol) alakítottuk, melyek kiküszöbölik a zavaró izomereket és anomereket. A redukció nátrium-borohidriddel történt, az acetilezést piridin ecetsav-anhidriddel végeztük. Inert gázként nitrogént alkalmaztunk, az áramlási sebesség 1,2 ml/perc, az injektálási hőmérséklet 300°C volt. Lángionizációs detektálást (FID – Flame Ionization Detection) követően az alábbiakban felsorolt oligoszacharid komponenseket (2. táblázat) azonosítottuk.



2. kép: Az oligoszacharidok (prebiotikumok) kivonata

Az azonosított oligoszacharid monomer egységek neve és relatív terület-aránya

Monomer egység neve	Relatív terület-arány (%)
Glükóz	71,310
Arabinóz	8,993
Xilóz	8,697
Galaktóz	6,815
Mannóz	4,185

### 4.1.3 Antocianinok

Az antocianinok (3. kép) kivonása magyar meggyből történt. A meggy kimagozását követően a mintát homogenizáltuk, majd a kinyeréshez metanol:víz:ecetsav = 25:24:1 arányú oldatot használtuk. A mintát 1 órán keresztül mágneses keverővel kevertük, átszűrtük, majd centrifugáltuk 10000 RPM-en, 5 percen keresztül. Ezt követően előre kondicionált csövekben (Supelclean ENVI-18 SPE) egyszerű frakcionálást végeztünk. A csöveket 5 ml metanollal, majd 5 ml vízzel kondicionáltuk, majd 1 ml gyümölcsmintát használtunk. Az eluálás során 20%-ban vizet tartalmazó metanololdatot alkalmaztunk, majd a bepárlás 40°C-on zajlott (BÜCHI ROTAVAPOR R-210, Flawil, Svájc). A minták szárítása vákuumban történt. A kivonat antocianin profiljának meghatározását VWR-Hitachi ChromasterUltraRs UHPLC (Hitachi, Tokió, Japán) berendezés segítségével, Phenomenex Kinetex® oszlopon (2,6 µm, XB-C18, 100 Å, 100 x 4,6 mm) (Phenomenex, Torrance, CA, USA) végeztük, az alábbi két oldószer alkalmazásával: A: metanol és B: 3% hangyasav. A folyamat a következő gradiens elúciós lépéseket foglalta magában: 0. perc oldószer A: 15%; 0–25. perc között oldószer A: 30%; 25–30. perc között oldószer A: 40%; 30–40. perc között oldószer A: 50%. Az áramlási sebesség 0,7 ml/perc, a hőmérséklet 25°C volt. Az antocianin komponensek mennyiségének meghatározására a megfelelő hiteles szabványok alapján került sor. Az UV-VIS detektálást 565 nm-en végeztük, betápláláskor 10 ml minta került injektálásra (NEMES és mtsai, 2018). A fő antocianin komponenseket a 3. táblázat tartalmazza (HOMOKI és mtsai, 2016).



*3. kép: Az antocianinokban gazdag meggykivonat*

*3. táblázat*

**Az azonosított antocianin komponensek neve és mennyisége**

<b>Az antocianin komponens neve</b>	<b>Mennyiség (mg/100 g)</b>
cyanidin-3-O-glucosyl-rutinoside	2,77-10,31
cyanidin-3-O-rutinoside	4,93-14,56
cyanidin-3-O-monoglucoside	2,02-7,79

## 4.2 Brojlercsirkével végzett vizsgálatok

A kísérletet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (DE MÁB) engedélyezte (engedélyszám: DEMÁB/12-7/2015).

### 4.2.1 A kísérleti beállítás és mintavétel

A kísérlet beállítása a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Kísérleti Telepén történt, Ross 308 genotípusú brojlercsirkékkel. A kísérletben összesen 900 vegyes ivarú egyed vett részt, melyek egynapos korukban érkeztek és brojlertápot kaptak (4. kép). A kísérleti takarmányt a csirkék az érkezés napjától kapták. A kísérlet ideje 42 napig tartott. A táp kukorica-szója alapú volt, a takarmányozás 4 fázisban történt. A takarmány összetevőit és az egyes fázisokat a 4. táblázat ismerteti. A tiszta ivóvíz minden esetben elérhető volt a csirkék számára, alomként pedig faforgáccsal gazdagítottuk a környezetet. Volierenként 60 egyed került elhelyezésre, kezelésenként 3 volier került kialakításra. A madarak megvilágítása OLANREWAJU és mtsai (2006) szerint történt, az alábbiak alapján: az első 7 napon 23h fény:1h sötét, a 8-28. napok között 20h fény:4h sötét, végül a 29-42. napok között 23h fény:1h sötét. A kontrollcsoporton kívül kialakításra került egy pozitív kontrollcsoport is, hiszen korábbi tanulmányok szerint az élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) sejtfalából származó  $\beta$ -glükán bizonyítottan immunmoduláns hatással rendelkezik. A pozitív kontrollcsoport esetén a hízótáphoz 0,05%-ban adtuk a  $\beta$ -glükánt. A kontroll és a pozitív kontrollcsoportokon kívül 3 további csoport került beállításra, melyeknél takarmánykiegészítőként a karotinoidokat, a magas arabino-galaktóz tartalmú oligoszacharidokat és az antocianinokat alkalmaztuk, kezelésenként 0,5%-ban.



4. kép: A csirkék elhelyezése a volierben

## A brojler hízótáp összetétele, valamint energia- és táplálóanyag-tartalma

Összetétel	Pre-starter (1-9. nap)	Indító (10-21. nap)	Nevelő (22-31. nap)	Befejező (32-42. nap)
Kukorica, %	33	34	33	32
Búza, %	27	29	31	32
Extrahált szójadara (46% nyersfehérje), %	29	24	20	16
Extrudált szója (46% nyersfehérje), %	4	6	4	4
Extrahált napraforgó, %		1	3	4
Takarmányélesztő, %	1			
DDGS, %		1	3	5
Növényi zsírok, olajok, %	2	1	3	4
Premix összetevők, %	4	4	3	3
Összesen, %	100	100	100	100
<b>Energia- és táplálóanyag-tartalom</b>				
Szárazanyag, %	89,06	89,03	89,15	89,15
AME <sub>n</sub> baromfi, MJ/kg	12,23	12,47	12,81	13,01
Nyersfehérje, %	21,58	20,28	19,05	18,28
Nyerszsír, %	4,61	4,83	6,22	6,83
Nyersrost, %	3,37	3,51	3,7	3,88
Lizin, %	1,37	1,27	1,17	1,09
Metionin, %	0,57	0,54	0,53	0,49
Metionin + Cisztein, %	0,94	0,9	0,87	0,83
Kalcium, %	0,85	0,73	0,71	0,67
Foszfor, %	0,63	0,55	0,52	0,49

DDGS (Distillers Dried Grains with Solubles): szárított gabonatörköly

AME<sub>n</sub>: látszólagos metabolizálható energia zéró nitrogénretencióra korrigálva

A brojlercsirkék élősúlyát 42 napos korban mértük. Az adatok alapján kiszámoltuk az átlagos napi súlygyarapodást. Az élősúly és az átlagos napi súlygyarapodás értékek egyedenkénti mérésen alapultak (n = 18/kezelés). Az átlagos napi takarmányfelvételt volierenként (n = 3) határoztuk meg.

Az immunválasz indukálása érdekében a kísérlet 26. napján (LI és mtsai, 2015a) kezelésként 6 hímivarú egyednek testtömeg-kilogrammonként 2 mg *Escherichia coli* O55:B5 baktérium sejtfalából származó lipopoliszachariddal (LPS) immunizáltunk, a kontrollcsoporton belül további 6 hímivarú egyednek fiziológiás sóoldattal is

beoltottunk annak érdekében, hogy szimuláljuk a tüszúrás által kiváltott stresszhatást (n = 6/kezelés; kontroll: n = 6 sóoldattal oltott és n = 6 LPS-sel immunizált).

12 óra elteltével (27. nap) a beoltott madarak az élősúly mérését követően cervikális diszlokáció által levágásra kerültek. A mintavétel során lép, csípőbél (ileum) és vérplazma mintákat gyűjtöttünk. A lép tömegének mérését követően az összes mintát -196°C-os folyékony nitrogénbe helyeztük, ezt követően a további felhasználásig -80°C-on tároltuk. A mintagyűjtés során további, körülbelül 1 cm-es ileummintákat gyűjtöttünk a csípőbél hátsó szakaszából (n=3/kezelés) és 10 %-os formalinban, szobahőmérsékleten tároltuk morfológiai paraméterek meghatározásának céljából (SALIM és mtsai, 2013). A mikrobiota-összetétel meghatározásához bélsármintákat gyűjtöttünk a kísérlet 19. napján (7. kép).

#### 4.2.2 RNS izolálás és cDNS szintézis

A teljes RNS izolálás során Direct-zol™ RNS MiniPrep Kit-et alkalmaztunk. A munkánk során a kit által javasolt protokoll alapján jártunk el, mely az alábbi lépéseket foglalta magában: A lép és az ileummintákból  $25 \pm 2,5$  mg-ot mértünk jégblokkban tartott centrifuga csövekbe. Következő lépésként 600  $\mu$ l TRI Reagenst adtunk a kimért szövetekhez, majd UltraTurrax segítségével lizáltuk a mintákat. Ezt követően a TRI Reagenssel megegyező mennyiségű (600  $\mu$ l) 95-100%-os etanolt mértünk a mintákhoz, majd vortexeltük őket. A kit által biztosított Zymo-Spin™ IIC oszlopokat gyűjtőcsövekbe raktuk, majd a mintákat az oszlopokra pipettáztuk. 16000 g-n 30 mp-ig centrifugáltuk, majd új gyűjtőcsövekbe helyeztük az oszlopokat.

Az RNS izolálás során a genomi DNS eltávolítása érdekében DNáz kezelést alkalmaztunk, mely a következő lépésekből állt: 400  $\mu$ l RNS mosópuffert pipettáztunk az oszlopokra, majd a mintákat centrifugáltuk az előbb ismertetett értéken. RNáz-mentes csőben mintánként számolva 5  $\mu$ l DNáz-t és 75  $\mu$ l DNS emésztőpuffert mértünk össze, az így kapott oldatból 80-80  $\mu$ l-t mértünk a mintákra, majd azokat szobahőmérsékleten 15 percig állni hagytuk. Ezt követően a mintákra 400  $\mu$ l RNS előmosópuffert mértünk, centrifugáltuk, és a folyamatot újra megismételtük. Ezután 700  $\mu$ l RNS mosópuffert adtunk a mintákhoz és a centrifugálást 16000 g-n 2 percig végeztük. Végezetül az oszlopokat Eppendorf csőbe tettük, DNS- és RNS-mentes vízből 50  $\mu$ l-t pipettáztunk közvetlenül az oszlopokra, majd centrifugáltuk a mintákat.

Az így kapott RNS koncentrációkat és az izolátumok tisztaságát NanoDrop ND-1000 spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével határoztuk meg. Az RNS koncentrációkat ng/μl-es mértékegységben kaptuk meg. A mérések során két aránypárt vettünk figyelembe: a 260/280 fehérjére nézve, míg a 260/230 aránypár szerves oldószerre nézve mutatja meg az minták tisztaságát. Mindkét aránypár 1,9-es érték felett fogadható el. Az RNS integritást 1%-os agaróz gélelektroforézis (Clever Scientific, Warwickshire, UK) segítségével ellenőriztük, az RNS-t a további felhasználásig -70°C-on tároltuk.

A kvantitatív PCR (qPCR) vizsgálatokhoz az RNS molekuláról reverz transzkriptáz segítségével DNS másolat készíthető. Az így szintetizált mRNS komplementer szálát nevezik cDNS-nek, ami már templátként használható a további mérésekhez (NYITRAI, 2013).

A reverz transzkripcióhoz a PCR BIO cDNA 16 Synthesis Kit-et alkalmaztuk. Egy reakció végtérfogata 20 μl volt, mely a következőket tartalmazta:

- 800 ng RNS
- 4 μl 5x cDNS szintézis mix, mely tartalmazta az oligo d(T) primereket, random hexamereket
- 1 μl 20x MMLV típusú reverz transzkriptáz
- desztillált víz

A reakció 40°C-on 30 percig, majd a reverz transzkriptáz denaturációja 85°C-on 10 percig tartott. Az így kapott cDNS-t tízszeresére (4 ng/μl) hígítottuk, majd -20°C-on tároltuk.

#### **4.2.3 Kvantitatív PCR (qPCR)**

A kvantitatív PCR során olyan referenciagén alkalmazása szükséges, mely valamely alapvető anyagcsere folyamatban részt vevő fehérjét határoz meg, illetve amelynek kifejeződésére a kísérlet körülményei nincsenek hatással. A lép és a csípőből (ileum) minták esetén a β-actin (*ACTB*), a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*GAPDH*), illetve a 18S riboszómális RNS (*RN18S*) génjét a következő 3 algoritmus

segítségével vizsgáltuk:  $\Delta Ct$ , Best Keeper, NormFinder. A 3 algoritmus alapján mértani középérték számítással a lép esetén a *GAPDH*, míg az ileumnál az *ACTB* bizonyult a legstabilabban kifejeződő referenciagénnek. A citokinek és receptorok génjeinek meghatározásához intront átívelő, forward és reverse primereket terveztünk a Primer Express v3.0.1 szoftver segítségével, mely primerek szekvenciáit az 5. táblázat ismerteti. A vizsgált génekhez tartozó oligonukleotid primerek szekvenciáit a National Center for Biotechnology Information (NCBI) Primer Blast segítségével ellenőriztük (YE és mtsai, 2012). A kvantitatív PCR-hez 384 mintára alkalmas plate-t (4titude, Surrey, UK) alkalmaztunk, a reakcióelegyeket 3 technikai ismétlésben vittük fel a plate-re. A reakció végtérfogata minden minta esetén 10  $\mu$ l volt, mely a következőket tartalmazta:

- 1  $\mu$ l (4 ng) cDNS
- 5  $\mu$ l 2x Xceed qPCR SG Hi-ROX MasterMix
- 0,2  $\mu$ l 200 nM forward oligonukleotid primer
- 0,2  $\mu$ l 200 nM reverse oligonukleotid primer
- 3,6  $\mu$ l desztillált víz

A reakciók összeállítását követően a plate-et 1500 g-n, 2 percig centrifugáltuk. A kvantitatív PCR-t Light Cycler 480 Instrument II típusú készülékkel (Roche Life Science, Penzberg, Németország) hajtottuk végre.

A qPCR a következő folyamatokból állt:

- denaturáció 95°C-on 2 percig,
  - denaturáció 95°C-on 5 mp-ig,
  - primerek tapadása/lánchosszabbítás 60°C-on 30 mp-ig.
- } 40 ciklus

A nyers fluoreszcens adatokat a LightCycler 1.5.0 szoftver segítségével gyűjtöttük ki. A LinReg PCR 2017.0 szoftver alkalmazásával az egyedi amplifikációs görbék alapján lineáris regresszióanalízissel meghatároztuk a reakciók hatékonyságát mind a referenciagén, mind a célgén esetén, illetve megkaptuk az amplifikációs görbékhez tartozó Ct (küszöbértékhez tartozó ciklusszám) értékeket. Az eredmények meghatározásához a Pfaffl módszert alkalmaztuk (PFAFFL, 2001), a citokinek és

receptorok esetén a vizsgált gén expresszióját a referenciagén expressziójához történő normalizálása által. Az alkalmazott módszer képletét a következő egyenlet írja le:

$$R = [(E_{\text{Célgén}})^{\Delta Ct_{\text{Célgén (Kontroll-Kísérlet)}}}] / [(E_{\text{Referenciagén}})^{\Delta Ct_{\text{Referenciagén (Kontroll-Kísérlet)}}}]$$

ahol:

- R: relatív expresszió,
- E: hatékonyság,
- Ct: küszöbértékhez tartozó ciklusszám.

A brojlercsirke citokinjeinek és receptorainak primer szekvenciái

Gén	Primerek szekvenciája (5'→3')	GénBank azonosító	Olvadáspont (°C)	Amplikon hossza (bp)
<i>IL-1β</i>	F: TGCTTCGTGCTGGAGTCACCC R: GGCCGGTACAGCGCAATGTT	XM_015297469.1	64,93 64,02	98
<i>IL-6</i>	F: AGCGAAAAGCAGAACGTCGAGTC R: GCCGAGTCTGGGATGACCACTTC	XM_015281283.2	63,73 64,94	107
<i>IFN-α</i>	F: ACTTCAGCTGCCTCCACACCTT R: CAGGAACCAGGCACGAGCTT	AM049251.1	64,14 62,74	92
<i>IFN-γ</i>	F: AACAACCTTCCTGATGGCGTGA R: GCTTTGCGCTGGATTCTCAAGT	NM_205149.1	62,46 62,02	89
<i>TLR-4</i>	F: ACCCGAACTGCAGTTTCTGGAT R: AGGTGCTGGAGTGAATTGGC	NM_001030693.1	62,20 60,61	120
<i>TLR-5</i>	F: ATGAGCTGAGGCTTTAGTTGGAGA R: CCAGCTAGTGCTATTCCAAAGACA	XM_025148815.1	61,61 60,62	108
<i>ACTB</i>	F: AGATCACAGCCCTGGCACCTAG R: TTGCGCTCAGGTGGGGCAAT	SIMON és mtsai, (2018)	63,80 65,22	61
<i>GAPDH</i>	F: GCTGGCATTGCACTGAATGAC R: CACTCCTTGGATGCCATGT	SIMON és mtsai, (2018)	60,73 57,42	113

#### 4.2.4 ELISA módszer

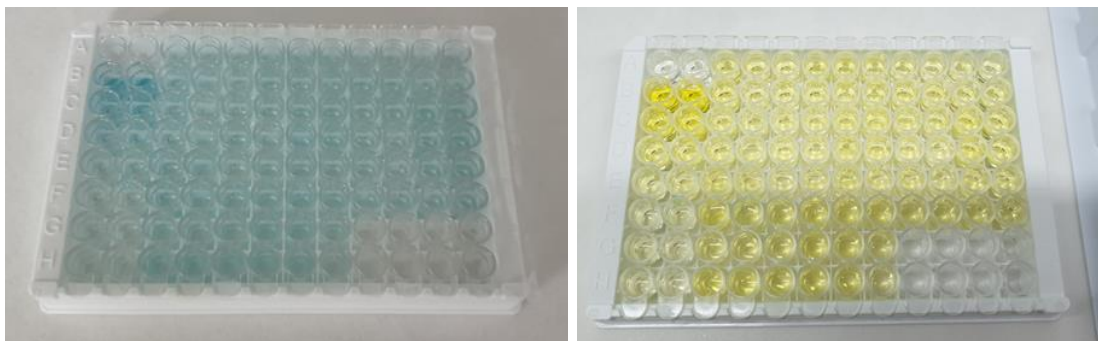
Az IL-1 $\beta$ , az IL-6 és az IgG fehérjék mérését vérplazmából végeztük, QnD Chicken IL-1beta, IL-6 és IgG ELISA Kit segítségével. A Kit-ek a dupla-szendvics ELISA technikát követték. A szendvics ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay – enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat) módszer lényege, hogy egy biotechnológiai cég által elkészített, 96 mintára alkalmas mikrotiter-plate vályúba a vizsgálni kívánt fehérjét (célfhérjét) felismerő, ismert mennyiségű antitestet rögzítenek. A célfhérjét tartalmazó minta hozzámérését, valamint a célfhérje bekötődését követően elsődleges és másodlagos antitestek oldatával inkubáljuk a mikroplate-et. A másodlagos antitesthez kapcsolódó enzim generálta színreakció alapján következtethetünk a vizsgálni kívánt fehérje mennyiségére, melynél a jel intenzitása és célfhérje mennyisége között egyenes arányosság áll fenn (WUNDERLICH, 2014).

A mikroplate-ek IL-1 $\beta$ , IL-6 vagy IgG monoklonális antitestet tartalmaztak, a detektált antitest biotinnel jelölt poliklonális antitest volt. A Kit alkalmazása során az avidin-peroxidáz enzim-konjugát a tetrametil-benzidin (TMB) szubsztrátot változtatta kék színűvé. Az ELISA assay alkalmazása során a Kit által javasolt protokollt követtük, mely az alábbi lépéseket foglalta magában:

A mikroplate-et felhasználás előtt 20 perccel kivettük a hűtőből és szobahőmérsékleten tartottuk, továbbá elkészítettük a Kit által javasolt standard sor hígításait, mely a következő hígítási sort foglalta magában: az IL-1 $\beta$ , IL-6 esetén 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 pg/ml és vak minta. Az IgG esetén 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,2; 15,6 ng/ml és vak minta. Ezt követően a standard sorból 100-100  $\mu$ l-t duplikátumban pipettáztunk a plate-re. A standard sor felvitelét követően a vérplazma mintákból is 100-100  $\mu$ l-t pipettáztunk az egyes vályúkba, majd a plate-et adhezív fóliával fedtük le. A minták felvitele a Kit által javasolt 5 perces időtartamon belül történt. Ezt követően a mintákat tartalmazó plate-et 37°C-on, 90 percig inkubáltuk Synergy HTX Multi-Mode Microplate Reader (BioTek, Winooski, Vermont, USA) készülékben. Az inkubálást követően a fölösleges folyadékot leöntöttük a plate-ről, majd az előzőleg elkészített mosófolyadékból (mosópuffer:molekuláris biológiai tisztaságú víz = 1:25) 350-350  $\mu$ l mennyiséget pipettáztunk az ELISA plate-re. A mosás folyamata ennél a lépésnél kétszer történt, a mosófolyadék hozzáadását követően

mindkét esetben 30 mp-et vártunk. Az ELISA plate-hez hozzáadtuk a biotinnel jelölt csirke IL-1 $\beta$  vagy IL-6 vagy IgG antitest folyadékot (antitest:antitesthígító = 1:100) vályúnként (kivéve a vak minta vályúit) 100-100  $\mu$ l-es mennyiségben, majd a plate-re fóliát tettünk és 37°C-on, 60 percig inkubáltuk. Az inkubálást követően a fölösleges folyadékot újra leöntöttük, majd a már ismertetett mosási folyamatot alkalmaztuk, ezúttal háromszor. Az ELISA mikroplate-re ezt követően az enzim-konjugátum folyadékból (enzim-konjugátum:enzim-konjugátumhígító = 1:100) vályúnként (kivéve a vak minta vályúit) 100-100  $\mu$ l-t mértünk, a mikroplate-re fóliát helyeztünk és 37°C-on, 30 percen keresztül újabb inkubálási folyamatot végeztünk. Az inkubálást ötszöri lépésben mosási folyamat követte.

Ezután a plate-en (a vak mintát is beleértve) minden vályúba 100-100  $\mu$ l-t mértünk a színreagens folyadékból (színreagens A:színreagens B = 9:1), majd a plate-et a 37°C-os inkubátorba helyeztük, mindaddig, amíg a standard sor esetén az erősebb színek, valamint a színgádiens meg nem jelent. Ez a folyamat körülbelül 10 percet vett igénybe. A színgádiens megjelenését követően az ELISA plate-re a színreagens C nevű folyadékból mértünk minden vályúba (a vak mintát is beleértve) 100-100  $\mu$ l-t, ami a kromogén reakciót megállította (5-6. kép). A mikroplate-et fólia nélkül újra a mikroplate olvasóba helyeztük, 10 mp-en keresztül a plate-et rázattuk, majd 10 percen belül leolvastuk a standard sor és a minták 450 nm-en mért abszorbancia értékét. Az egyes mintákhoz tartozó IL-1 $\beta$ , IL-6 és IgG koncentrációkat a HTX Synergy Multi-Mode Microplate Reader és a Gen5 3.03 szoftver segítségével számoltuk ki, ahol a standard sor koncentrációi alapján lineáris standard kalibrációs görbét vettünk fel, melynek x tengelye a koncentrációkat, y tengelye az abszorbancia értékeket tartalmazta.



5-6. kép: Az IgG meghatározása a brojlercsirke vérplazmában ELISA módszerrel (A1, A2: vak minta; B1, B2 – H1, H2: standard sor; A3 – H8: a kezelések mintái; G9-12 és H9-12: üres vályúk)

#### 4.2.5 Bakteriális DNS izolálás és a polimeráz láncreakció (PCR)

A béltraktus mikrobiota vizsgálatához bélsármintából izoláltunk DNS-t. A bakteriális DNS izoláláshoz az E.Z.N.A.<sup>®</sup> Stool DNA Kit-et alkalmaztuk, melynek során az alábbi lépéseket követtük: A sejtfeltárás érdekében 200 mg bélsármintához 200 mg „Glass Beads X”-et mértünk, majd a mintákhoz 540 µl SLX-Mlus puffert pipettáztunk. Ezt követően a mintákat 10 percig homogenizáltuk. A fehérje eltávolításához 60 µl DS puffert és 20 µl Proteináz-K oldatot mértünk. Vortexelés után a mintákat BioSan TS-100 Thermo-Shakerben (BioSan, Riga, Lettország) inkubáltuk 70°C-on, 10 percig, majd 95°C-on, 5 percig (8. kép). 200 µl SP2 puffer hozzáadását, majd 30 mp vortexelést követően a mintákat jégblokkba helyeztük 5 percig, ezt követően 18000 g-n szintén 5 percig centrifugáltuk. A centrifugálás után a felülúszóból 400 µl-t új centrifugacsövekbe mértünk és a felülúszóra 200 µl cHTR reagenst pipettáztunk. Vortexelés után a mintákat szobahőmérsékleten tartottuk 2 percig, majd ismét centrifugálás következett. Az így képződött felülúszóból 250 µl-t szintén új centrifugacsövekbe pipettáztunk, majd 250 µl BL puffert, továbbá 100%-os etanolt mértünk a mintákhoz. 10 perc homogenizálást követően a kit által biztosított HiBind<sup>®</sup> DNS Mini oszlopokat gyűjtőcsövekbe raktuk, majd a mintákat az így elkészített oszlopokra pipettáztuk. 20800 g-n 1 percig centrifugáltuk, majd a DNS oszlopokat új gyűjtőcsövekbe helyeztük és 500 µl VHB puffert pipettáztunk az izolátumhoz. 30 mp centrifugálást követően az átfolyt folyadékot kiöntöttük, majd az oszlopokat a már használt gyűjtőcsövekbe raktuk vissza. 700 µl DNS mosópuffert mértünk az oszlopokra, majd a mintákat 1 percig centrifugáltuk. A folyamatot megismételtük 2 perces centrifugálási időtartammal. A DNS oszlopokat ezt követően centrifugacsövekbe tettük, majd az előmelegített eluáló pufferből 100-100 µl-t mértünk az oszlopokra. A minták 2 percen keresztül szobahőmérsékleten álltak, majd 1 percen keresztül centrifugálás következett.

A DNS koncentrációjának meghatározása a 4.2.2 pontban ismertetett módszerrel azonosan történt. A DNS-t a további felhasználásig -20°C-on tároltuk.



7-8. kép: A bélsár mintavétel és a bakteriális DNS izolálásának inkubációs lépése

A DNS izolálást követően (n=6/kezelés) PCR technika segítségével a *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* és *Escherichia coli* csoportokra specifikus primerpárokkal amplifikáltuk a bakteriális DNS-t. Alkalmaztunk továbbá egy univerzális baktérium primerpárt is, mely a felsorolt baktériumcsoportok megegyezést mutató 16S rDNS szakaszára volt tervezve. Ezt az univerzális primerpárt a teljes mikrobiota populáció meghatározására használtuk, majd az egyes baktériumcsoportokat ehhez hasonlítottuk. A primerek szekvenciáit és a hozzájuk tartozó szakirodalmi forrást a 6. táblázat jelöli. A polimeráz láncreakciót PCRmax Alpha Cycler (PCRmax, Staffordshire, UK) segítségével hajtottuk végre, a reakciók végtérfogata 20  $\mu$ l volt, mely a következőket tartalmazta:

- 2  $\mu$ l (10 ng) DNS templát
- 0,1  $\mu$ l (0,5 U) DreamTaq polimeráz
- 0,2  $\mu$ l 200 nM forward oligonukleotid primer
- 0,2  $\mu$ l 200 nM reverse oligonukleotid primer
- 2  $\mu$ l 10x DreamTaq Zöld Puffer
- 0,4  $\mu$ l 10 mM dNTP
- 1,6  $\mu$ l 25 mM MgCl<sub>2</sub>
- 13,5  $\mu$ l desztillált víz

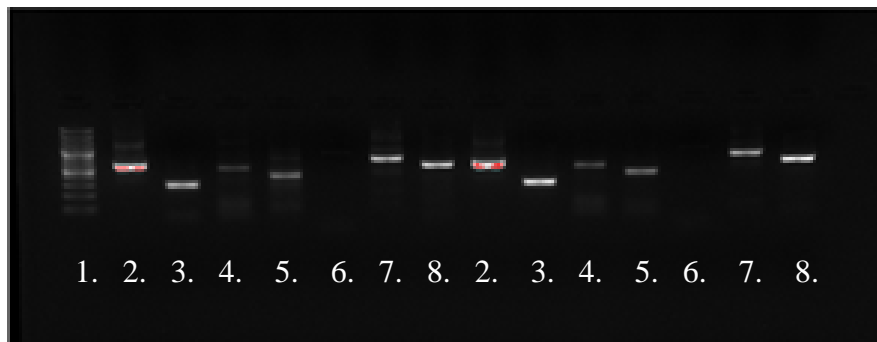
A PCR az alábbi kondíciókból állt:

- polimeráz aktiváció: 95°C-on 1 percig,
  - denaturáció 95°C-on 30 mp-ig,
  - anelláció 60°C-on 30 mp-ig,
  - elongáció 72°C-on 1 percig,
  - végső elongáció 72°C-on 5 percig.
- } 35 ciklus

A vizsgált baktériumcsoportok 16S rDNS-re tervezett primerek szekvenciái

Baktériumcsoport	Primerek szekvenciája (5'→3')	Referencia	Olvadáspon (C°)	Amplikon hossza (bp)
Univerzális baktérium	F: CGTGCCAGCCGCGGTAATACG R: GGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACAT	AMIT-ROMACH és mtsai (2004)	66,47 74,79	611
<i>Lactobacillus</i>	F: CATCCAGTGCAAACCTAAGAG R: GATCCGCTTGCCCTTCGCA	WANG és mtsai (1996)	56,61 60,82	286
<i>Bifidobacterium</i>	F: GGGTGGTAATGCCGGATG R: CCACCGTTACACCGGAA	LANGENDIJK és mtsai (1995)	57,84 59,26	510
<i>Campylobacter</i>	F: ATCTAATGGCTTAACCATTAAC R: GGACGGTAAGTAGTTTAGTATT	DENIS és mtsai (2001)	52,84 52,80	857
<i>Clostridium</i>	F: AAAGGAAGATTAATACCGCATAA R: ATCTTGCGACCGTACTCCCC	AMIT-ROMACH és mtsai (2004)	53,88 61,67	722
<i>Salmonella</i>	F: CGGGCCTCTTGCCATCAGGTG R: CACATCCGACTTGACAGACCG	AMIT-ROMACH és mtsai (2004)	65,67 61	396
<i>Escherichia coli</i>	F: GACCTCGGTTTAGTTCACAGA R: CACACGCTGACGCTGACCA	CANDRIAN és mtsai (1991), WANG és mtsai (1996)	57,34 63,13	585

A PCR termékeket 2%-os agaróz gélelektroforézis (Clever Scientific, Warwickshire, UK) segítségével futtattuk meg. A gélek elemzését Bio-Rad Gel Doc XR+ géldokumentációs rendszer (Bio-Rad Laboratories, Kalifornia, USA) alkalmazásával végeztük. A gélek (9. kép) értékelésénél az ImageLab szoftver „relatív mennyiség” opcióját használtuk, ahol az univerzális baktérium primerekkel kapott PCR terméket (teljes baktériumszám) 100%-nak vettük és ehhez képest határoztuk meg a *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Salmonella* és az *E. coli* csoportok relatív arányát (AMIT-ROMACH és mtsai, 2004).



9. kép: A baktériumcsoportok 16S rDNS PCR termékei 2 minta esetén

1. DNS létra (100 bp), 2. Univerzális baktérium primer PCR terméke, 3. *Lactobacillus*,
4. *Bifidobacterium*, 5. *Salmonella*, 6. *Campylobacter*, 7. *Clostridium*, 8. *Escherichia coli*

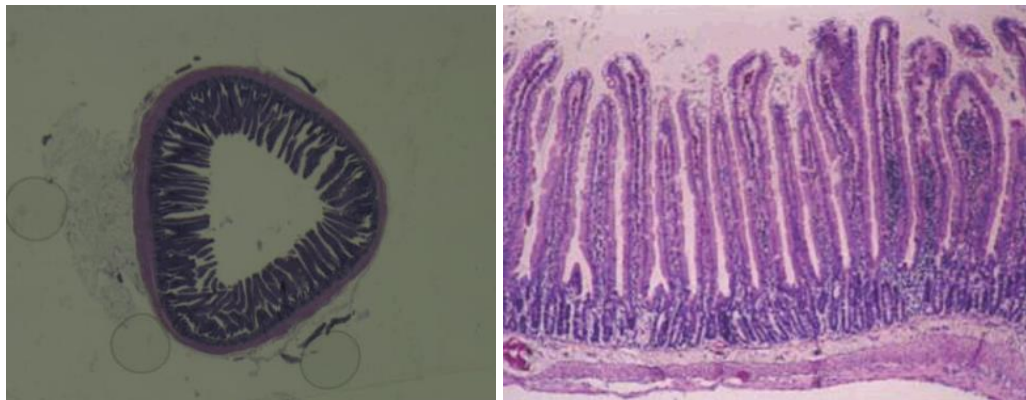
#### 4.2.6 Intesztinális morfológiai vizsgálat

A formalinban tárolt csípőbél mintákból (n=3/kezelés) a következő paraméterek kerültek meghatározásra:

- villus (bélboholy) hossz,
- kriptamélység,
- a villushossz és a kriptamélység aránya,
- teljes *mucosa* (bélnyálkahártyaréteg) vastagság.

Az ileummintákból metszeteket vágunk, majd hematoxilin-eozin festést végeztünk. Ezt követően a festett metszetekről fotókat készítettünk Zeiss SteREO V8 típusú mikroszkóphoz kapcsolt Zeiss Camera (Carl Zeiss, Jena, Németország) segítségével (10-11. kép) (FISCHER és mtsai, 2008). A felsorolt paraméterek méréséhez az Adobe Photoshop CC version 19.1.6 szoftvert alkalmaztuk, amelyben

a vizsgált tulajdonságokról metszetenként 12-12 adatot gyűjtöttünk. A szoftver vonalzó eszközének segítségével megmértük az 1 mm-nek megfelelő képpontok kiterjedését, ami 152 képpont volt. Ezt követően a mérés skálán 1 mm logikai hosszak 152 képpontot állítottunk be, majd vonalzóval megmértük a kriptamélysegeket és a teljes *mucosa* vastagságát. A villusok területét gyorskijelölő eszköz segítségével határoztuk meg. A vizsgálatok során a villushosszt a villus csúcsától a bélnyálkahártya kötőszövetes rétegének (*lamina propria mucosae*) tetejéig; a kriptamélységet a villuskripta határtól a kripta aljáig; a teljes *mucosa* vastagságot a villus csúcsától a bélfalig mértük, mely magában foglalta a villus hosszát, a kriptamélységet és az izomréteget (*muscularis mucosae*) (MUNYAKA és mtsai, 2012).



10-11. kép: A morfológiai vizsgálatához alkalmazott csirke ileum szöveti metszetek

#### 4.2.7 Viselkedés-megfigyelés

A madarak viselkedését a kísérlet 25., valamint a 32. napján, délelőtti (9:00-10:00) és délutáni (14:00-15:00) napszakokban tanulmányoztuk. A megfigyelés során a kontrollcsoportot és a kezeléseket is 1-1 órán keresztül (volierenként 20 percig) figyeltük. A viselkedésminták közül a takarmánycsipegetést, az ivóvízfogyasztást, a pihenést, a járkálást és a szárnynyújtogatást vettük szemügyre. A voliereket egyesével figyeltük. A megfigyelésnek nem volt sorrendje, az összes kezelés megfigyelése egyszerre történt (adott időben, adott kezelés 1 volierjét 1 személy figyelte). Volierenként az összes egyed látható volt. Minden tevékenység esetén minden második percben jegyeztük fel az adott cselekvést végző madarak számát. Az eredmények az adott tevékenységek gyakoriságában (%) kerültek meghatározásra.

### 4.3 Ponttyal végzett vizsgálatok

A kísérletet a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (DE MÁB) engedélyezte (engedélyszám: 15/2019/DEMÁB).

#### 4.3.1 A kísérleti beállítás és mintavétel

A kísérlet beállítása (12-13. kép) a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Halbiológiai Laboratóriumában történt. A kísérletben összesen 132 egynyaras ponty vett részt, melyek saját szaporításból származtak, nevelésük intenzív recirkulációs rendszerben történt. A halak kezdeti nedves testtömege  $123,45 \pm 0,37$  g volt, a kísérlet ideje 6 hétig tartott. A pontyok takarmányozása saját receptúra alapján készült alaptakarmánnyal történt (kontrollcsoport), melynek szemcsemérete 3 mm volt. Kialakításra került továbbá 3 kísérleti csoport is, melyekhez a már korábban ismertetett bioaktív növényi hatóanyagokat (karotinoidok, oligoszacharidok, antocianinok) 1-1%-ban adtuk. A takarmány összetételét, valamint a számított energia- és táplálóanyag-tartalmat a 7. táblázat mutatja be. A kontrollcsoport és a kezelések 3 ismétlésben kerültek beállításra, medencénként 11 egyeddel. A medencék hasznos víztérfogata 350 liter volt, a rendszer mechanikai és biológiai szűrőket tartalmazott. A halak takarmányozása napi háromszori alkalommal (8:00, 12:00, 16:00), kézi adagolással történt.



12-13. kép: A pontykísérlet beállítása és a mintavétel

**A haltakarmány összetétele, valamint energia- és táplálóanyag-tartalma**

<b>Összetétel</b>	<b>Kontroll takarmány</b>	<b>Karotinoid kezelés</b>	<b>Oligoszacharid kezelés</b>	<b>Antocianin kezelés</b>
Baromfi melléktermék-liszt, %	20	20	20	20
Vérliszt (sertés hemoglobin), %	2	2	2	2
JPC 56 szójafehérje koncentrátum, %	10	10	10	10
Halliszt, %	15	15	15	15
Premix, %	2	2	2	2
Zeolit, %	2	2	2	2
Glükóz, %	1	1	1	1
Halolaj, %	2	2	2	2
Kísérleti takarmánykiegészítő, %	0	1	1	1
Búzaliszt, %	46	45	45	45
<b>Összesen, %</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>Energia- és táplálóanyag-tartalom</b>				
DE, MJ/kg	15,04	14,92	14,92	14,92
Száranyag, %	90,26	90,39	90,39	90,39
Nyersfehérje, %	33,5	33,39	33,39	33,39
Nyerszsír, %	6,91	6,9	6,9	6,9
Nyersrost, %	1,32	1,3	1,3	1,3
Hamu, %	6,09	6,8	6,8	6,08

DE (Digestible Energy): emészthető energia

A mintavétel a kísérlet 6. hetén történt, mely során a teljes lép és a középbél középső szakaszáról származó szövetmintákat gyűjtöttünk. A mintákat a felhasználásig -80°C-on tároltuk. A középbél középső szakaszáról további, 1 cm-es mintát gyűjtöttünk, melyet PBS (foszfáttal pufferolt sóoldat) oldattal tisztítottunk, ezt követően 10%-os formalinban tároltuk, morfológiai paraméterek mérésének céljából.

#### 4.3.2 RNS izolálás és cDNS szintézis

A teljes RNS izolálás a 4.2.2 pontban ismertetett módszerrel azonosan történt. A cDNS szintézishez a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-et alkalmaztuk. A reakciók végtérfogata 20 µl volt, mely a következőket tartalmazta:

- 400 ng RNS,
- 1  $\mu$ l oligo (dT)<sub>18</sub> primer,
- 2  $\mu$ l 10 mM dNTP mix,
- 1  $\mu$ l reverz transzkriptáz enzim,
- 4  $\mu$ l 5X reverz transzkripció puffer,
- 1  $\mu$ l RNáz inhibitor,
- nukleáz-mentes víz.

A cDNS szintézis körülményei a következők voltak:

- inkubáció 65°C-on 30 percig,
- termináció 85°C-on 5 percig.

Az átírt cDNS-t tízszeresére (2 ng/ $\mu$ l) hígítottuk és a felhasználásig -20°C-on tároltuk.

#### 4.3.3 Kvantitatív PCR (qPCR)

A génexpressziós vizsgálatok elvégzése a 4.2.3 pontban leírtakhoz hasonlóan történt, így ebben a fejezetben az eltéréseket ismertetjük. A ponty lép és középbél szövetminták esetén az *ACTB*, a *GAPDH* és a *40S* referenciagének közül a lépnél a *40S*, a középbélnél a *GAPDH* bizonyult a legstabilabban kifejeződő referenciagénnek. A vizsgálatba vont citokinek génjeihez szükséges oligonukleotid primerek tervezését az Oligo 7 szoftver segítségével végeztük. A primerek szekvenciáit az 8. táblázat tartalmazza.

A reakciók végtérfogata minden minta esetén 10  $\mu$ l volt, mely a következőket tartalmazta:

- 2  $\mu$ l (4 ng) cDNS
- 2  $\mu$ l 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix
- 0,2  $\mu$ l 200 nM forward oligonukleotid primer
- 0,2  $\mu$ l 200 nM reverse oligonukleotid primer
- 5,6  $\mu$ l desztillált víz

A qPCR a következő lépésekből állt:

- enzim aktiváció: 95°C-on 12 percig,
  - denaturáció: 95°C-on 15 mp-ig,
  - anelláció: 60°C-on 20 mp-ig,
  - elongáció: 72°C-on 20 mp-ig.
- } 40 ciklus

A génexpressziós eredmények kiszámításához ugyancsak a Pfaffl módszert alkalmaztuk.

## A ponty citokinek primer szekvenciái

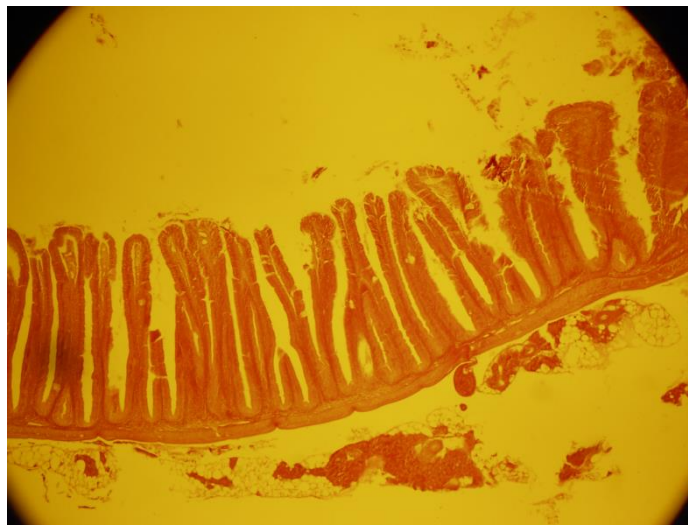
Gén	Primerek szekvenciája (5'→3')	GénBank azonosító	Olvadáspont (°C)	Amplikon hossza (bp)
<i>IL-1β</i>	F: AACACCATCACAGCCGATGACC R: TTGTAAGCCGTGCCCCGTCTC	XM_019111088.1	63,14 62,78	77
<i>IL-8</i>	F: AGCTCTTCCCTCCAAGCTCACAC R: AACCCAGGGTGCAGTAGGGTCCA	XM_019099676.1	64,33 67,36	101
<i>TNF-α</i>	F: ACTTCCAAGGCAGCCATCCAT R: CAAGCCGCCTGAAGTGAAAGC	XM_019088899.1	62,10 62,65	108
<i>IRF-1</i>	F: TCAGCAGCAGTTCTGAGAGTGGA R: GCGCATTCTGGACACAGGCAT	XM_019072461.1	52,17 57,14	115
<i>GAPDH</i>	F: ACGAGGACAAGACCAAATCAGGC R: CGGGTCACCAGACGCCCAA	XM_019119762.1	62,99 64,77	79
<i>40S</i>	F: CCGTGGGTGACATCGTTACA R: TCAGGACATTGAACCTCACTGTCT	URÁN és mtsai, 2008	60,04 61,48	69

#### 4.3.4 Intesztinális morfológiai vizsgálat

A formalinban tárolt középbélmintákból a következő paramétereket határoztuk meg:

- villushossz,
- villusszélesség,
- bélfal izomrétegének vastagsága.

A középbélmintákból (n = 3/kezelés) metszeteket vágunk, majd hematoxilin-eozin festést végeztünk (14. kép). Ezt követően a festett metszetekről mikroszkópi fotókat készítettünk Olympus DP71 típusú mikroszkóphoz kapcsolt Olympus Camera (Olympus, Tokió, Japán) segítségével. A felsorolt paraméterek méréséhez a cellSens Entry szoftvert alkalmaztuk.



14. kép: A ponty középbélszakasz metszetéről készített mikroszkópi fotó

## 4.4 Statisztikai analízis

A statisztikai analízist a GraphPad Prism 7.0 szoftver segítségével végeztük. A szélsőséges értékeket a GraphPad outlier kalkulátor segítségével szűrtük ki. Az elemzések során egyutas varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk. A minták egyenlő szóródását a Bartlett-féle teszttel ellenőriztük. Ezt követően a *post hoc* teszteknel Tukey-tesztet használtunk, a változók egyenlő szóródásának nem teljesülése esetén Tamhane-féle T2 tesztet alkalmaztunk. A viselkedés-megfigyelésnél kétutas varianciaanalízist használtunk, ahol a volierek külön faktorként kerültek tesztelésre. A csoportok közötti különbségeket  $p < 0,05$  érték esetén tekintettük szignifikánsnak. Az eredményeket átlag  $\pm$  SEM (Standard Error of Mean – az átlag szórásából adódó standard hiba) értékekben adtuk meg. A termelési paraméterek esetén az átlagértékek mellett az RMSE (Root Mean Square Error – átlag négyzetes hiba gyöke) értékek kerültek megadásra.

## 5. EREDMÉNYEK ÉS AZOK ÉRTÉKELÉSE

### 5.1 A brojlercsirkével végzett vizsgálatok eredményei

#### 5.1.1 A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke termelési paramétereire

Az alkalmazott bioaktív hatóanyagoknak a brojlercsirke termelési paramétereire kifejtett hatásának eredményeit az 9. táblázat tartalmazza. A termelési paraméterek közül az élősúly, az átlagos napi súlygyarapodás, valamint az átlagos napi takarmányfelvétel került meghatározásra. A kezelések nem gyakoroltak hatást az élősúlyra a kontrollcsoporthoz mérten. Az átlagos napi súlygyarapodást a teljes kísérlet időtartama alatt egyik kezelés sem befolyásolta. A brojlercsirkék átlagos napi takarmányfelvételét a kontrollcsoporthoz képest (73 g/nap/madár) a  $\beta$ -glükános (83 g/nap/madár), az oligoszacharidos (82 g/nap/madár) és az antocianinos (88 g/nap/madár) kiegészítés egyaránt növelte.

9. táblázat

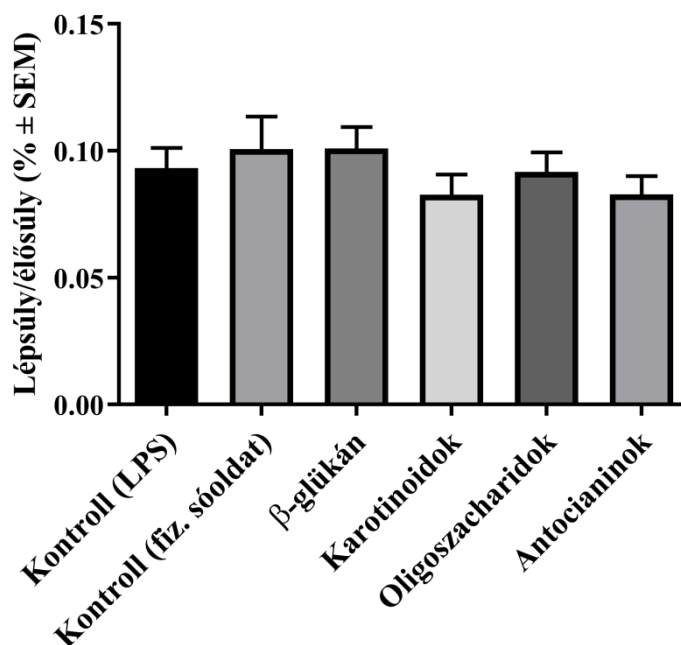
#### A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke termelési paramétereire

Termelési paraméter	Kezelés					RMSE*
	Kont.	$\beta$ -gl.	Karot.	Oligosz.	Antoc.	
Átlagos élősúly (g/madár) 42. nap	2758	2727	2748	2618	2590	98
Átlagos napi súlygyarapodás (g/nap/madár) 1-42. nap	65	64	65	61	61	2
Átlagos napi takarmányfelvétel (g/nap/madár) 1-42. nap	73 <sup>a</sup>	83 <sup>b</sup>	81 <sup>a,b</sup>	82 <sup>b</sup>	88 <sup>b</sup>	6

a, b = Soronként az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek. Az eredmények átlag és RMSE értékekben jelennek meg. Kont. = kontroll csoport;  $\beta$ -gl. =  $\beta$ -glükán kezelés; Karot. = karotinoid kezelés; Oligosz. = oligoszacharid kezelés; Antoc. = antocianin kezelés. \*RMSE = Átlagos négyzetes hiba gyöke.

Az eredményekkel ellentétben, ZHANG és mtsai (2013) a takarmányhoz  $\beta(1-3)(1-6)$ -D-glükánt keverték 50, valamint 75 mg/kg-os koncentrációban és növekedést tapasztaltak a csirkék élősúlyában. Az eredményekhez hasonlóan, REZAEI és mtsai (2015) ugyancsak a brojlerek változatlan átlagos napi súlygyarapodásáról számoltak be, amikor a takarmányt 0,5- és 1%-ban oligoszacharid kivonattal egészítették ki. A szerzők az oligoszacharid kivonat alacsony koncentrációi miatt valószínűsítették, hogy a takarmánykiegészítő a brojlerek béltraktusában élő hasznos baktériumok növekedését és élettevékenységét nem fokozta. ZHANG és mtsai (2013) szintén fokozott takarmányfelvételt figyeltek meg a csirkéknél az 50, valamint 75 mg/kg  $\beta(1-3)(1-6)$ -D-glükán kiegészítés hatására. REZAEI és mtsai (2015) is megváltozott termelési paraméterről számoltak be a teljes kísérleti időszak (1-35 nap) során, amikor a takarmányhoz 1%-ban adtak oligoszacharid kivonatot. A szerzők a takarmánykiegészítés hatására a brojlerek kedvezőbb takarmányértékesítéséről számoltak be a kontrollcsoport madaraihoz képest.

### 5.1.2 A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke immunológiai paramétereire

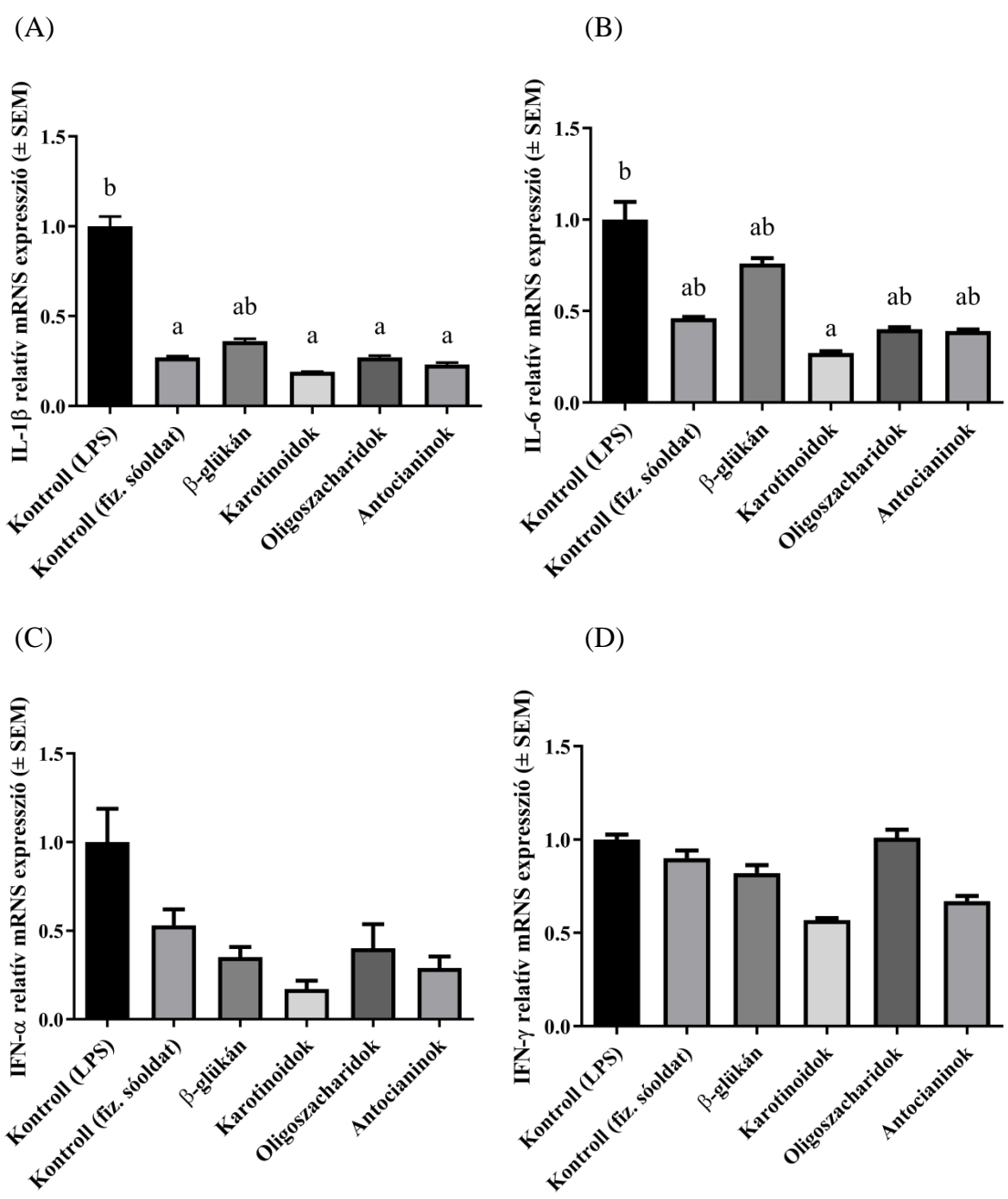


1. ábra: A brojlercsirke lépsúlyának mérési eredményei az élősúlyhoz viszonyítva a bioaktív növényi hatóanyagok hatására

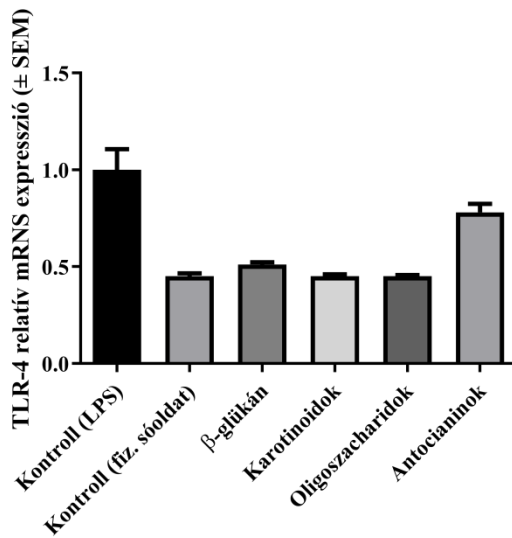
A brojlercsirke lépsúly eredményeinek (1. ábra) értékelése során azt tapasztaltuk, hogy az élősúlyhoz viszonyított lépsúly az LPS-immunizált kontrollcsoportnál 0,093%, a fiziológias sóoldattal injektált kontrollcsoportnál 0,10%, a  $\beta$ -glükánnal kiegészített takarmány hatására 0,1%, a karotinoidos kezelés hatására 0,082%, az oligoszacharidos kezelésnél 0,091% és az antocianinos kezelés hatására 0,082% volt. A kezelések hatására az élősúlyhoz viszonyított lépsúly nem mutatott különbséget a kontroll (LPS) csoporthoz képest.

Az alkalmazott bioaktív növényi hatóanyagok nem befolyásolták a brojlercsirkék lépsúlyát. Hasonló eredményeket figyeltek meg SHANG és mtsai (2015) és a brojlercsirkék egészséges immunstátuszáról számoltak be, ugyanis a lép és a Fabricius-tömlő immunszervek relatív tömege nem változott 21 napos korban, amikor kísérlet során frukto-oligoszacharidokat alkalmaztak takarmánykiegészítőként és *Salmonella enteritidis* sejtfalából származó lipopoliszachariddal (LPS) immunizálták a csirkéket. Ugyanerre a megállapításra jutottak, amikor  $\beta$ -glükánnal történő takarmánykiegészítés hatására a brojlerek testsúlyához viszonyított lép súlya nem változott a kontrollcsoportok és a kezelések között a kísérlet 14. és 38. napján (RATHGEBER és mtsai, 2008). WANG és mtsai (2016) szintén a brojlerek változatlan lépsúlyáról számoltak be élesztő alkalmazását követően. KAMBOH és mtsai (2016) a brojlercsirkéknél magasabb lép indexet ( $p < 0,01$ ) mértek 21 napos korban, amikor a takarmány bioflavonoidokat (genistein:hesperidin=1:4, 20 mg/kg) tartalmazott és a brojlereket LPS-sel immunizálták; ám a bioflavonoidokat kisebb koncentrációban vagy önmagában alkalmazva, azok nem befolyásolták a csirkék lép indexét.

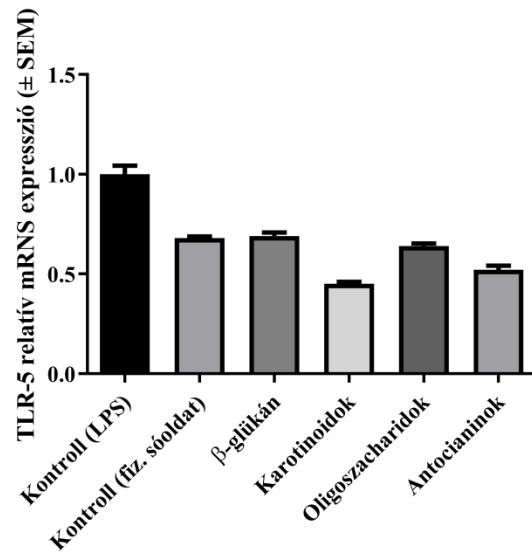
A brojlercsirke lépében mért citokinek (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IFN- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* ) és receptorok (*TLR-4*, *TLR-5*) mRNS expressziója a kontrollcsoportnál és az egyes kezeléseknél a 2. ábrán jelenik meg. A citokinek és receptorok Ct-értékei (átlag  $\pm$  szórás) a lépben az alábbiak szerint alakultak: *IL-1 $\beta$* :  $34,226 \pm 1,198$ ; *IL-6*:  $33,299 \pm 1,434$ ; *IFN- $\alpha$* :  $23,354 \pm 1,395$ ; *IFN- $\gamma$* :  $32,192 \pm 1,138$ ; *TLR-4*:  $29,793 \pm 1,350$ ; *TLR-5*:  $33,606 \pm 1,501$ . Ezek az értékek jelzik a citokinek és receptorok mRNS expresszióját.



(E)



(F)

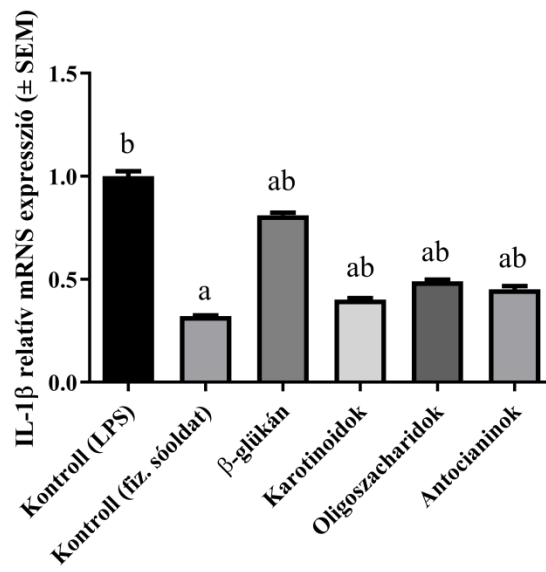


a, b:  $p < 0,05$

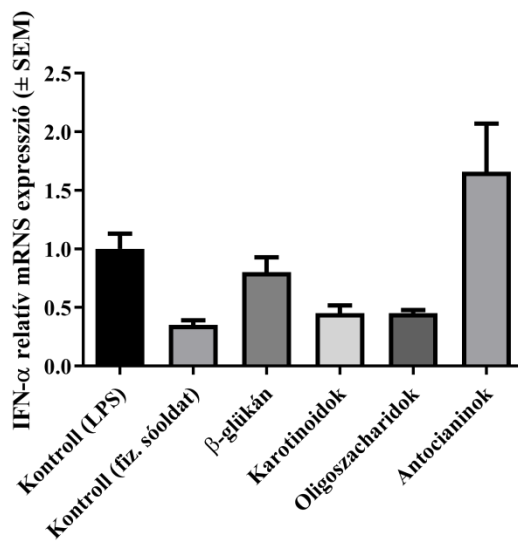
2. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke citokinjeinek és receptorainak relatív génexpressziójára a lépben

Az eredmények alapján elmondható, hogy a β-glükánnal történő takarmánykiegészítés nem gyakorolt hatást a vizsgált gének expressziójára. A karotinoidos kezelés több mint 80%-kal alacsonyabb ( $p = 0,0114$ ) *IL-1β* génexpressziót eredményezett a lépben az LPS-sel immunizált kontrollcsoporthoz képest (2/A ábra). A karotinoidok csökkentették ( $p = 0,0325$ ) az *IL-6* génexpresszióját is a lépben az LPS-sel injektált kontrollcsoportéhoz mérten és az említett citokinnek több mint 70%-kal alacsonyabb mRNS szintjét eredményezték (2/B ábra). A karotinoidok az *IFN-α*, az *IFN-γ*, a *TLR-4* és a *TLR-5* mRNS expressziójára nem gyakoroltak hatást (2/C, D, E, F ábrák). Az *IL-1β* génexpressziója a lépben körülbelül 70%-kal csökkent ( $p = 0,0497$ ) az oligoszacharidos kezelés hatására is (2/A ábra), ám a további gének kifejeződésére a kezelés nem gyakorolt hatást. Az antocianinok majdcsak 80%-kal csökkentették az *IL-1β* ( $p = 0,0303$ ) mRNS szintjét (2/A ábra), ám a további citokinek és receptorok génjeinek kifejeződését nem befolyásolták a kontroll (LPS) csoportéhoz képest.

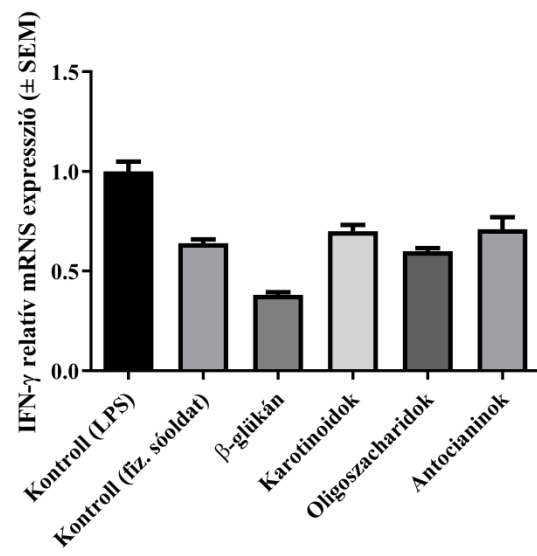
(A)

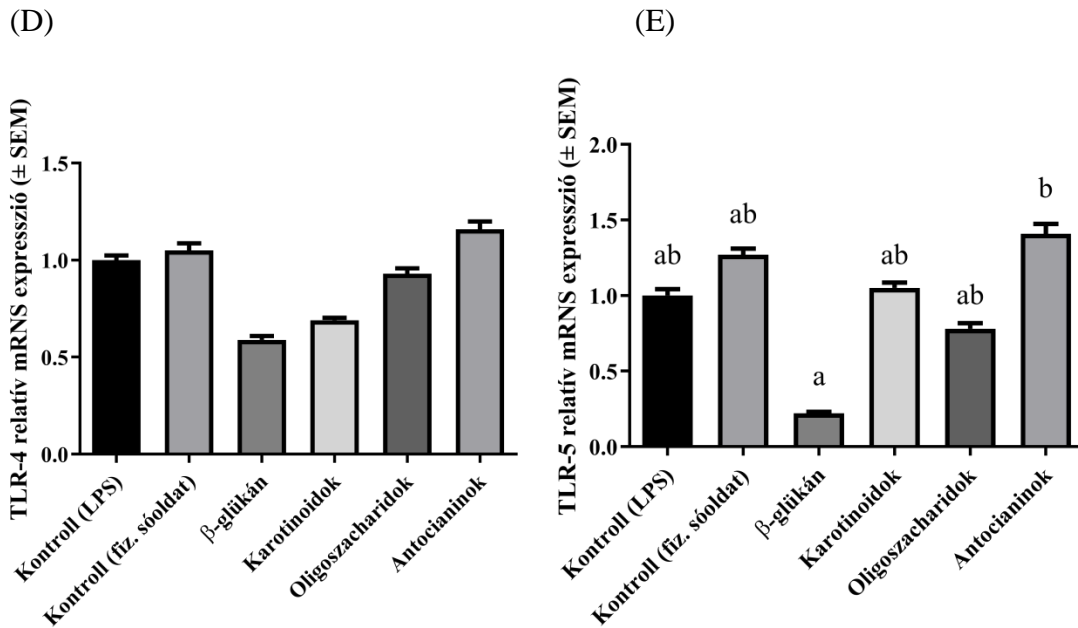


(B)



(C)





a, b:  $p < 0,05$

3. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke citokinjeinek és receptorainak relatív génexpressziójára az ileumban

A brojlercsirke csípőbélben (ileum) mért citokinek és receptorok mRNA expressziója az egyes kezelések hatására a 3. ábrán láthatók. A citokinek és receptorok Ct-értékei (átlag ± szórás) az ileumban a következők szerint alakultak: *IL-1β*:  $34,120 \pm 1,222$ ; *IFN-α*:  $23,911 \pm 1,962$ ; *IFN-γ*:  $31,342 \pm 1,868$ ; *TLR-4*:  $30,256 \pm 1,668$ ; *TLR-5*:  $33,441 \pm 2,486$ . Ezek az értékek jelzik a citokinek és receptorok mRNA expresszióját az ileumban.

A β-glükános csoportnál az ileumban alacsonyabb *TLR-5* génexpressziót ( $p = 0,0387$ ) mértünk az antocianinos kezeléshez képest és a *TLR-5* mRNA szintje 22%-ra csökkent (3/E ábra). Az *IL-1β*, *IFN-α*, *IFN-γ*, *TLR-4* és *TLR-5* esetén nem tapasztaltunk különbséget a kontroll (LPS) csoporthoz képest. A karotinoidoknak és az oligoszacharidoknak nem volt hatása az ileális interleukin, interferon és toll-like receptor profilra (3/A, B, C, D, E ábrák). Az antocianinos kezelés nem gyakorolt hatást az ileális citokin mRNA expresszióra, ám a *TLR-5* génexpressziója 141%-ra emelkedett az említett kezelésnél a β-glükán (pozitív kontroll) csoporthoz mérten (3/E ábra). Az *IL-6* a csípőbélben nem expresszálódott.

A kísérlet során a  $\beta$ -glükánnal történő takarmánykiegészítést pozitív kontrollként alkalmaztuk, miután korábbi tanulmányok arról számoltak be, hogy a  $\beta$ -glükán képes a csirkék megfelelő immunstátuszának fenntartására a szervezet valamely mikrobiális fertőzése alatt. Példaként a  $\beta(1-3)(1-6)$ -D-glükán képes volt csökkenteni a gyulladáskeltő TNF- $\alpha$  citokin, valamint a kortizol szintet a szérumban (VETVICKA – OLIVEIRA, 2014). Egy másik tanulmányban szintén az élesztősejtfal pozitív immunológiai hatását bizonyították, ugyanis növelte a bőr túlérzékenységi reakcióját, ami a celluláris immunválasz egyik közvetett faktora (MORALES-LOPEZ – BRUFAU, 2013). SHEN és mtsai (2009) a *Saccharomyces cerevisiae* fokozott hatásáról számoltak be, amikor a takarmánykiegészítés hatására sertésszérumban a gyulladáskeltő IFN- $\gamma$  citokin alacsony szintjét mérték. Az élesztő szintén csökkentette a szérum gyulladáskeltő IL-1 $\beta$  citokin szintjét is, LPS-injektált sertések esetén (COLLIER és mtsai, 2011). WANG és mtsai (2016) ugyancsak kiemelték az élesztő immunstátuszra gyakorolt pozitív hatását LPS-sel immunizált brojlerknél, miután az élesztő csökkentette az IL-1 $\beta$  szintjét.

A vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a kísérletben alkalmazott  $\beta$ -glükános kezelés nem volt hatással a lépben, illetve az ileumban mért citokinek (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IFN- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* ) és receptorok (*TLR-4*, *TLR-5*) génexpressziós szintjére az LPS-sel injektált kontrollcsoporthoz képest. Ezekkel az eredményekkel megegyezően, MARKAZI és mtsai (2017) nem tapasztaltak változást az élesztősejtfalból származó termékek alkalmazását követően, hiszen vizsgálataik alapján az *IL-1 $\beta$*  mRNS szintje nem változott a csirkék vakbélmandulájában kokcidiózis fertőzés alatt. KUMAR és mtsai (2011) a  $\beta$ -glükános kezelés hatására szintén változatlan *IL-1 $\beta$* , *TLR-4* és *TLR-5* génexpressziós szintet határoztak meg a csirkék lépében, LPS-immunizált madarakhoz képest. A génexpressziós vizsgálatok során egyetlen esetben tapasztaltunk változást a  $\beta$ -glükános takarmánykiegészítés hatására, amikor a kezelés csökkentette az ileális *TLR-5* mRNS expressziót az antocianinos kezeléshez képest. SHEORAN és mtsai (2017) a csökkent *TLR-5* génexpressziós szintet a patogének csökkenő kolonizációjával hozták összefüggésbe. SHANMUGASUNDARAM és mtsai (2014) szintén megállapították, hogy az élesztőből előállított termékek hozzáadását követően fokozottá vált a hasznos baktériumok – mint a *Lactobacillusok* és *Bifidobacteriumok* – növekedése, ezáltal az alacsonyabb *TLR-5* mRNS expressziót ugyancsak mikrobiális okokkal magyarázták.

A karotinoidokkal történő takarmánykiegészítés hatását ugyancsak megvizsgáltuk a brojlercsirke citokinjeinek és receptorainak génexpressziós szintjére nézve. A várthoz mérten, a lépben és az ileumban is magas volt a gyulladáskeltő *IL-1 $\beta$*  mRNS szintje az LPS-immunizált madaraknál, a fiziológias sóoldattal injektált kontroll egyedekhez képest. Következtetésként elmondható, hogy a kísérlet során alkalmazott *Escherichia coli* sejtfalból származó LPS akut immunválasz kialakulását és bakteriális megbetegedést eredményezett (WU és mtsai, 2017). MUNYAKA és mtsai (2012) szintén ezt tapasztalták és magas *IL-1 $\beta$*  génexpressziós szintet határoztak meg LPS-sel fertőzött csirkék lépében, a fiziológias sóoldattal injektált madarakéhoz képest. A vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a karotinoidok képesek csökkenteni a lépben mért gyulladással *IL-1 $\beta$*  génexpressziós szintet a kontroll (LPS) csoporthoz képest, ám az ileumban mért *IL-1 $\beta$*  mRNS expressziójára a karotinoidok nem gyakoroltak hatást. GAO és mtsai (2012) a szintén a karotinoidok csoportjába sorolható, xantofillok hatását vizsgálták 20 és 40 mg/kg koncentrációban a takarmányban és azt tapasztalták, hogy a xantofillok nem gyakoroltak hatást az ileumban mért gyulladáskeltő citokinek szintjére. Az interleukin-1 $\beta$ -hoz hasonlóan, a proinflammatorikus interleukin-6 citokin felszaporodása egyaránt akutfázis reakcióként magyarázható (HONG és mtsai, 2006). A vizsgálataink során magas *IL-6* génexpressziós szintet mértünk az LPS-sel oltott kontroll brojlereknél, ehhez mérten a karotinoidok hatására csökkent az *IL-6* mRNS szintje a lépben. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy a karotinoidok képesek a gyulladással paraméterek csökkentésére, ezáltal a gyulladás mértékének mérséklése szempontjából hasznos takarmánykiegészítőnek bizonyulhatnak. SHANMUGASUNDARAM és SELVARAJ (2011) ugyanerre a következtetésre jutottak, amikor a lutein (karotinoid) kiegészítés csökkentette az *IL-1 $\beta$*  génexpressziót LPS-fertőzött pulykáknál.

A természetes prebiotikumként alkalmazott, magas arabino-galaktóz tartalmú oligoszacharidok a brojlerek citokinjeinek génexpressziójára kifejtett hatását úgyszintén megmértük. Az alkalmazott oligoszacharidok a proinflammatorikus *IL-1 $\beta$*  alacsony génexpresszióját eredményezték a csirkék lépében, mely eredmény azt mutatja, hogy az oligoszacharidok hatékonyak lehetnek a gyulladás fokának enyhítésében. Az oligoszacharidok nem befolyásolták az ileumban mért *IL-1 $\beta$*  mRNS expressziót.

A takarmánykiegészítőként alkalmazott antocianinoknak a madár immunválaszra kifejtett hatását is megfigyeltük, mely során megállapítottuk, hogy az antocianinok az *IL-1 $\beta$*  alacsonyabb génexpressziós szintjét eredményezték a lépben.

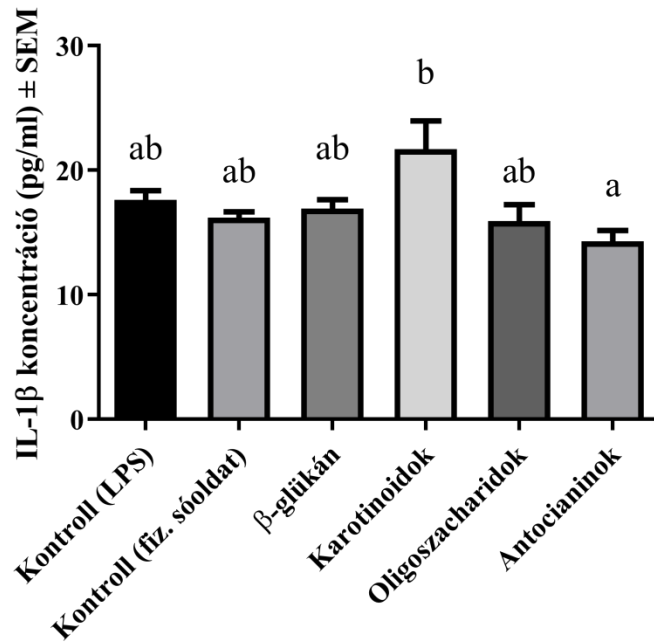
CHANGXING és mtsai (2018) szintén az antocianinok hatását tanulmányozták és meghatározták, hogy antocianin-kiegészítés csökkentti a ciclooxigenáz-1 (COX-1) és ciclooxigenáz-2 (COX-2) gyulladáscsökkentő enzimek szintjét, ezáltal gátolja a proinflammatorikus interleukinek expresszióját. LI és mtsai (2014) antocianinokban gazdag fragmentumot alkalmaztak egerek etetésénél, ami gátolta az *IL-1 $\beta$*  mRNS expresszióját. Az antocianinok gyulladáscsökkentő hatását CARVALHO és mtsai (2015) is megerősítették, amikor az antocianin-kiegészítés csökkentette a gyulladáskeltő citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ ) szintjét etídium-bromiddal indukált patkányoknál. Jelen kutatásban az antocianinok nem gyakoroltak hatást az ileális interleukin-1 $\beta$  génexpressziójára.

A karotinoidok kivételével, a további komponensek nem voltak hatással a lépben mért *IL-6* mRNS expresszióra. Ehhez hasonlóan, egy másik tanulmányban a galaktoglükomannán oligoszacharid-arabinoxilán hatását vizsgálva a szerzők szintén nem tapasztaltak hatást a lépben kifejeződő *IL-6* mRNS szintjére vonatkozóan (FABER és mtsai, 2012). Ezekkel ellentétben, a xylo-oligoszacharidokat 2 g/kg-os koncentrációban alkalmazva a takarmányban, a szerzők alacsony *IL-6* mRNS szintet mértek a vakbélmandulában *Salmonella*-immunizált csirkéknél.

Sem a karotinoidok, sem az oligoszacharidok, sem pedig az antocianinok nem befolyásolták a *TLR-4*, *TLR-5*, *IFN- $\alpha$*  és *IFN- $\gamma$*  citokinek mRNS expresszióját. Miután a toll-like receptor 4 lipopoliszacharid-felismerő receptor, az LPS-sel immunizált kontroll csoportnál magasabb *TLR-4* relatív expresszióra számítottunk a fiziológiás sóoldattal oltott egyedekhez viszonyítva. TAN és mtsai (2014) magasabb *TLR-4* génexpressziót határoztak meg LPS-injektált csirkék lépében, míg a takarmánykiegészítés hatására alacsonyabb *TLR-4* génexpressziót mértek. Ezzel szemben, vizsgálataink során az egyes kezelések alkalmazását követően nem tapasztaltunk hatást sem a lépben, sem az ileumban mért *TLR-4* mRNS szintben. Ehhez hasonlóan, KUMAR és mtsai (2011) is megállapították, hogy a  $\beta$ -glükánt 0,1%-ban alkalmazva az nem befolyásolta a *TLR-4* génexpressziót a csirkék lépében, habár a kísérlet során LPS immunizálás sem történt. Vizsgálataink során a *TLR-5* génexpressziós szintjében sem tapasztaltunk különbséget a kezelt csirkék és a kontrollcsoport között. Ezzel ellentétben, SHEORAN és mtsai (2017) alacsony *TLR-5* mRNS szintet mértek a csirkék vérében, amikor 0,5 g/kg, 1 g/kg és 2 g/kg koncentrációban mannán-oligoszacharid alapú prebiotikumot alkalmaztak takarmánykiegészítőként. Következtetésként arra jutottak, hogy a mannán-

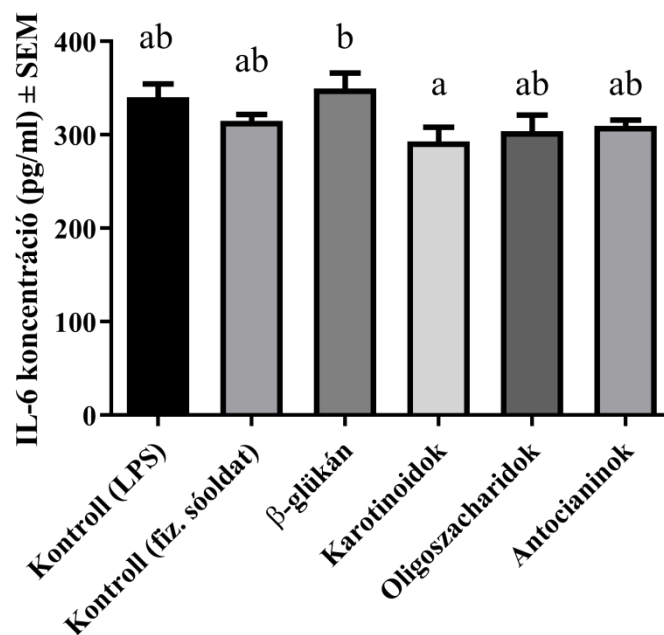
oligoszacharid képes csökkenteni olyan Gram-negatív baktériumok kolonizációját, melyek flagellinnel rendelkeznek, mint például az *E. coli* vagy *Salmonella* spp. Az alkalmazott növényi hatóanyagok szintén nem befolyásolták az *IFN- $\alpha$*  citokin mRNS szintjeit sem. Ezzel ellentétben, KHAN és mtsai (2020) magasabb *IFN- $\alpha$*  génexpressziót mértek olyan tojók lépében, amelyeket Fertőző Bronchitis vírus (IBV) T törzsével fertőztek. A szerzők a magas *IFN- $\alpha$*  génexpressziót azzal magyarázták, hogy a madarak szervezete érzékelt a virális RNS-t és az immunrendszer megindította a védekező mechanizmusokat. A génexpressziós mérések során a proinflammatorikus *IFN- $\gamma$*  citokin szintje ugyancsak változatlan maradt az egyes kezelések hatására. Ezzel ellentétben, LI és mtsai (2015b) emelkedett *IFN- $\gamma$*  génexpressziós szintet mértek LPS-immunizált csirkék lépében, továbbá COX és mtsai (2010a) is magasabb *IFN- $\gamma$*  mRNS expressziót mutattak ki *Eimeria oocisztákkal* fertőzött csirkék lépében. Kísérletük során takarmánykiegészítőként  $\beta$ -glükánt használtak, melynek hatására csökkent az említett citokin szintje. POURABEDIN és mtsai (2017) a mannán-oligoszacharidok hatását vizsgálták 1 g/kg-os koncentrációban a takarmányban. Az említett oligoszacharidok gátolták a gyulladáskeltő *IFN- $\gamma$*  génjének kifejeződését a csirkék vakbélmandulájában, miközben a madarak *Salmonella enteritidis* fertőzés alatt álltak. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy az *IFN- $\gamma$*  fokozza a makrofágok aktivációját és a nitrogén-oxid termelődését.

A brojlercsirke vérplazmájában mért, az immunválasz kialakulásában résztvevő citokinek (IL-1 $\beta$ , IL-6) koncentrációi a 4. és 5. ábrákon láthatók. A brojlercsirke vérplazmájában meghatározott IL-1 $\beta$  citokin koncentrációja a kontroll (LPS) csoportnál 19,80 pg/ml; a kontroll (fiz. sóoldat) csoportnál 13,25 pg/ml; a  $\beta$ -glükános kezelésnél 16,40 pg/ml; a karotinoidok hatására 25,50 pg/ml; az oligoszacharidos kezelés esetén 12,17 pg/ml; az antocianinos kiegészítés hatására 17,20 pg/ml volt. A brojlercsirke vérplazmájában meghatározott IL-6 citokin koncentrációja a kontroll (LPS) csoport esetén 340,3 pg/ml; a kontroll (fiz. sóoldat) csoportnál 314,8 pg/ml; a  $\beta$ -glükános kezelés hatására 349,5 pg/ml; a karotinoidos kiegészítés hatására 292,7 pg/ml; az oligoszacharidos kezelés esetén 303,8 pg/ml; az antocianinos kiegészítésnél 309,3 pg/ml volt.



a, b:  $p < 0,05$

4. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke IL-1β citokin koncentrációjára a vérplazmában



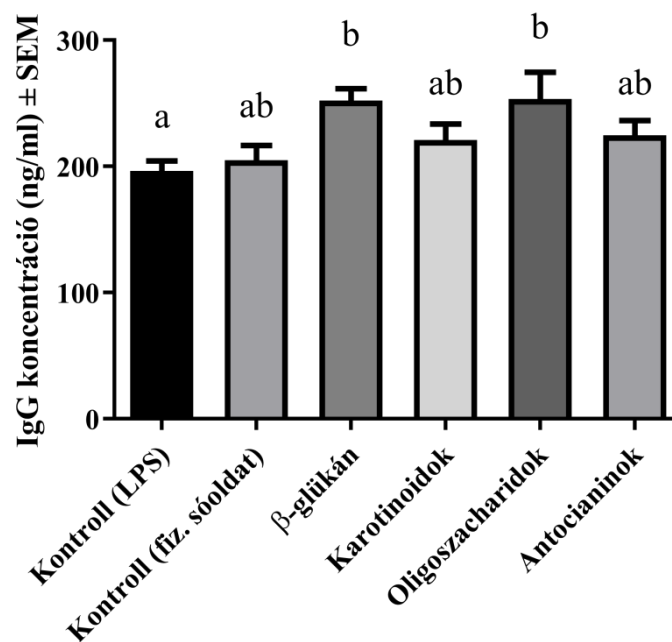
a, b:  $p < 0,05$

5. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke IL-6 citokin koncentrációjára a vérplazmában

Az *IL-1 $\beta$*  citokin mRNS szinten szignifikánsan csökkenő szintet mutatott a karotinoidok, az oligoszacharidok és antocianinok hatására, azonban fehérjeszinten a kezelések hatására nem tapasztaltunk eltérést az LPS-immunizált kontrollcsoporthoz képest. Az *IL-1 $\beta$*  szintje az antocianinok hatására alacsonyabb volt ( $p = 0,0133$ ) a karotinoidos kezeléshez viszonyítva. Az *IL-6* citokin mRNS expressziója a karotinoidos kezelés hatására csökkent, míg fehérjeszinten is a karotinoidok hatására mutatott alacsonyabb ( $p = 0,0466$ ) koncentrációt a  $\beta$ -glükán csoporthoz viszonyítva. Az LPS-sel injektált kontrollcsoporthoz képest fehérjeszinten egyik kezelés hatására sem tapasztaltunk eltérést.

Az mRNS- és a fehérje-expresszió közötti korreláció hiánya jónéhány okkal magyarázható, melyekből egyszerre több is fennállhat. Az mRNS fehérjévé való translációja előtt számos bonyolult poszt-transzkripciós folyamatok zajlanak le, melyek pontosan nem ismertek. Okozhatja továbbá az a tény is, hogy a fehérjék különböző fél-életidővel rendelkeznek, ami a változatos fehérjeszintézis és degradáció eredménye (GREENBAUM és mtsai, 2003). A fehérjék fél-életidejével jellemezhető az úgynevezett protein „turnover”, amit számos körülmény befolyásolhat. A sejtek képesek szabályozni egy adott fehérje degradációját, szintézisét (JUHÁSZ és mtsai, 2013). Befolyásolhatja végül az eredményt az is, hogy az mRNS és fehérjevizsgálatok során számos hibalehetőség, és „zaj” limitálhatja a vizsgált molekulák expressziójáról kapott végeredményt (GREENBAUM és mtsai, 2003).

A humorális immunválaszban résztvevő IgG antitest koncentrációja a 6. ábrán látható. A brojlercsirke vérplazma IgG koncentrációja az egyes kezeléseknél a következő értékeket mutatta: kontroll (LPS) csoportnál 196,4 ng/ml; a kontroll (fiz. sóoldat) csoport esetén 205 ng/ml; a  $\beta$ -glükános kezelés hatására 252,1 ng/ml; a karotinoidos kiegészítésnél 220,8 ng/ml; az oligoszachariddal kezelt csoport esetén 253,5 ng/ml; az antocianinos kiegészítésnél 224,6 ng/ml.



a, b:  $p < 0,05$

**6. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke IgG koncentrációjára a vérplazmában**

Az IgG koncentrációja nőtt a  $\beta$ -glükán (pozitív kontroll) csoport esetén ( $p = 0,0382$ ), valamint az oligoszacharidos kezelés ( $p = 0,0449$ ) hatására, míg a további kezelések (karotinoidok és antocianinok) nem gyakoroltak hatást a brojlercsirkék vérplazma IgG szintjére. Az eredményekhez hasonlóan, az IgG szintje ugyancsak emelkedett BAKSHSHALINEJAD és mtsai (2018) tanulmányában is, amikor takarmánykiegészítőt alkalmaztak és SRBC-vel (sheep red blood cell - bárányból származó vörösvérsejt) immunizálták a csirkéket. CAI és mtsai (2012) kísérletében a takarmánykiegészítés hatására ugyancsak növekedett az IgG szintje brojlereknél, amit

a szerzők a csirkék humorális immunválaszának fejlődésével magyarázták. A vérplazma IgG szintje szintén növekedett 21 napos csirkéknél, melyek 2 mg/kg xylo-oligoszachariddal kiegészített hízótápot kaptak. A szerzők ezt a xylo-oligoszacharidok immunfunkciót javító hatásával magyarázták (YUAN és mtsai, 2018). Az IgG szintje magasabb volt 21 és 42 napos csirkék ileumában is, továbbá 42 napos korban a jejunumban is, amikor a takarmány mannán-oligoszacharidokat tartalmazott 0,5 g/kg, 1 g/kg és 1,5 g/kg koncentrációban (ZHOU és mtsai, 2019).

### **5.1.3 A bioaktív hatóanyagok hatása a brojlercsirke intesztinális morfológiájára**

A brojlercsirke ileumban mért morfológiai paraméterek mérési eredményei a 10. táblázatban olvashatók. Az ileumban mért villusok (bélbolyhok) hossza nagyobb volt a  $\beta$ -glükános ( $p < 0,0001$ ), a karotinoidos ( $p < 0,0001$ ), az oligoszacharidos ( $p < 0,0001$ ), és az antocianinos ( $p < 0,0001$ ) takarmánykiegészítés hatására is, míg a két kontrollcsoport között nem volt különbség. A kezelések közül az oligoszacharidos kezelésnél nőtt ( $p < 0,0001$ ) a kriptamélység. A kontroll (fiz. sóoldat) csoport esetén kisebb ( $p = 0,0009$ ) kriptamélységet határoztunk meg a kontroll (LPS) csoporthoz képest, míg a  $\beta$ -glükános és antocianinos kezelés között nem tapasztaltunk különbséget a kriptamélységeket illetően. A villushossz:kriptamélység aránya magasabb volt a  $\beta$ -glükános kezelésnél ( $p < 0,0001$ ), valamint az antocianinos kezelésnél ( $p = 0,0063$ ) a lipopoliszachariddal oltott kontrollcsoporthoz képest. A villushossz:kriptamélység arányokat tekintve a kontroll (fiz. sóoldat), a karotinoidos és az oligoszacharidos kezelések között nem tapasztaltunk különbséget. A csípőbélben a legnagyobb bélnyálkahártyaréteg-vastagságot a  $\beta$ -glükános ( $p < 0,0001$ ), az oligoszacharidos ( $p < 0,0001$ ) és az antocianinos kezelés ( $p = 0,048$ ) hatására mértünk, míg a kontroll (fiz. sóoldat) és karotinoidos kezelések között nem tapasztaltunk eltérést.

A brojlersirke intesztinális morfológiai paramétereinek eredményei a bioaktív növényi hatóanyagok hatására

Morfológiai paraméter	Kezelés						<i>p</i> -érték
	Kontroll (LPS)	Kontroll (fiz.só)	β-glükán	Karotinoidok	Oligoszacharidok	Antocianinok	
Villushossz (μm)	774,31±20,3 <sup>a</sup>	712,02±13,1 <sup>a</sup>	998,93±11,9 <sup>b</sup>	908,94±11,8 <sup>b</sup>	977,08±24,1 <sup>b</sup>	921,84±17,8 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0,0001
Kriptamélység (μm)	140,38 ±5,9 <sup>b,c</sup>	107,31±2,9 <sup>a</sup>	120,43 ±3,6 <sup>a,b</sup>	160,27±7,5 <sup>c</sup>	179,90±6,2 <sup>d</sup>	134,47±3,9 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0,0001
Villushossz: kriptamélység	5,83 ±0,2 <sup>a,b</sup>	6,81±0,2 <sup>b,c</sup>	8,57±0,2 <sup>d</sup>	6,19±0,3 <sup>a,b,c</sup>	5,70±0,2 <sup>a</sup>	7,12±0,2 <sup>c</sup>	<i>p</i> < 0,0001
Teljes mucosa vastagság (μm)	1156,89±24,2 <sup>a,c</sup>	1137,47±19,2 <sup>a</sup>	1350,07±28,7 <sup>b</sup>	1251,06 ±14,2 <sup>b,c</sup>	1346,49±28,6 <sup>b</sup>	1286,38±20,5 <sup>b</sup>	<i>p</i> < 0,0001

a, b, c, d = Soronként az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek.

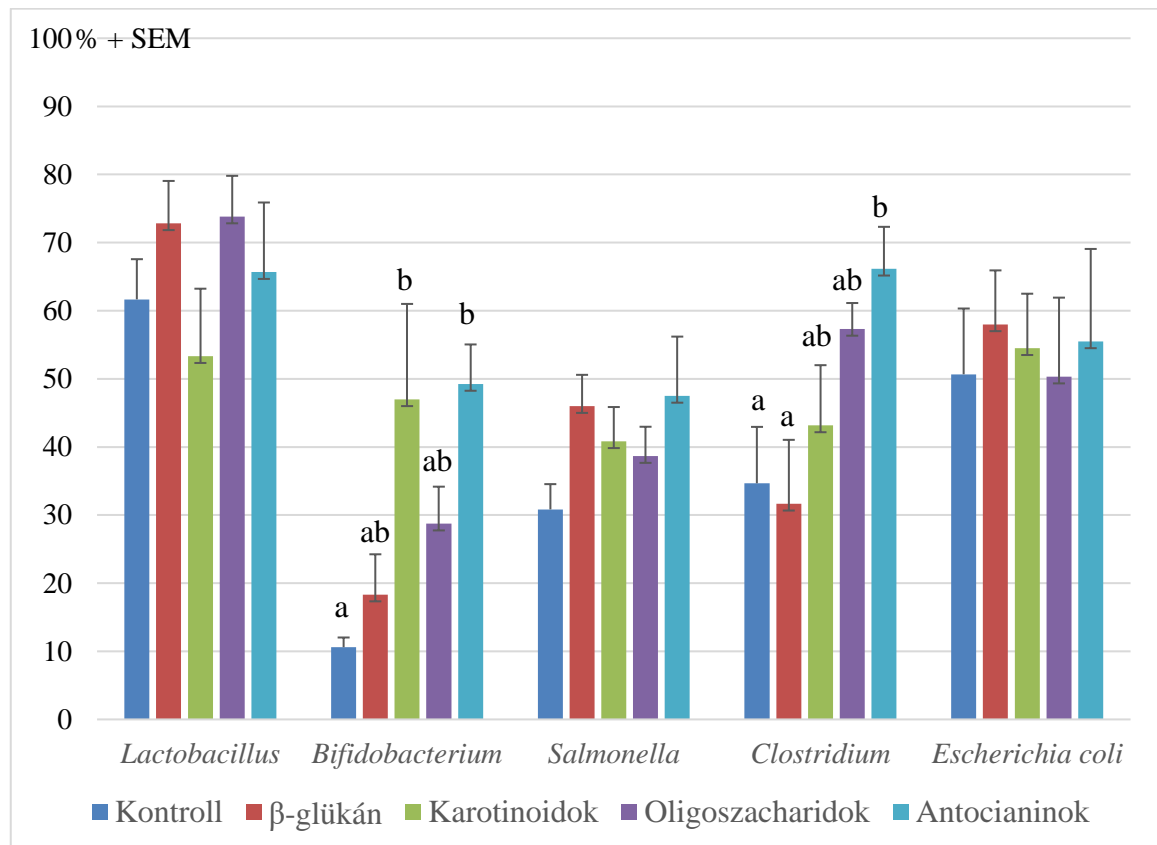
Az eredmények átlag ± SEM értékekben jelennek meg.

A bélnyálkahártya integritása, valamint morfológiája kritikus mutatója a megfelelő táplálóanyag-felhasználásnak, valamint az immunfunkciónak (LI és mtsai, 2020). A hosszabb villusok és rövidebb kriptamélységek nagyobb felületet biztosítanak az emésztési folyamatoknak, ezáltal fokozzák a tápanyagok felszívódását (MUNYAKA és mtsai, 2012). A villusok hosszának és a kripta mélységeinek nagyobb aránya ugyancsak a hatékonyabb tápanyagfelszívódást szolgálja (SONG és mtsai, 2019).

Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a  $\beta$ -glükán, a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok egyaránt növelték a bélbolyhok hosszát, mely hatás a felszívódási funkciók szempontjából előnyös. A kezelések közül az oligoszacharidok növelték a kriptamélységet, a további kezelések nem voltak hatással a kriptamélységre. A fiziológiás sóoldattal injektált egyedeknél alacsonyabb kriptamélységet mértünk az LPS-sel oltott kontroll madarakhoz képest. A villushossz:kriptamélység arányát tekintve a  $\beta$ -glükán és az antocianin kezelésnél kaptunk magas értékeket, vastagabb bélnyálkahártyaréteget pedig a  $\beta$ -glükán, az oligoszacharid és az antocianin takarmánykiegészítés alkalmazásának hatására mértünk. Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy az alkalmazott bioaktív növényi hatóanyagok növelték a táplálóanyagok felszívódási felületét a brojlerek csípőbelében. Az eredményeinkhez hasonlóan, SHANG és mtsai (2015) 0,5%-os frukto-oligoszacharidos kezelés hatására hosszabb villusokat, nagyobb kriptamélységet és vastagabb bélnyálkahártyaréteget mértek *E. coli* sejtfalból származó LPS-sel immunizált csirkéknél. XU és mtsai (2003) ugyancsak hosszabb villusokat és nagyobb villushossz:kriptamélység arányokat határoztak meg csirkék ileumában 0,4%-os frukto-oligoszacharidos kiegészítés hatására. A szerzők a kedvező változásokat a frukto-oligoszacharidoknak a béltraktus mikrobiális környezetére kifejtett jótékony hatásával magyarázták. SHANMUGASUNDARAM és mtsai. (2013) nagyobb villushossz:kriptamélység arányról számoltak be csirkéknél, élesztősejtfallal kiegészített takarmányozás hatására. A szerzők úgy vélték, a két paraméter nagyobb aránya a tápanyagok felszívódását, valamint a termelési paraméterek javulását egyaránt elősegítheti.

#### 5.1.4 A bioaktív hatóanyagok hatása a brojlercsirke bél-mikrobiota összetételére

A brojlercsirke bélsármintáiból meghatározott *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium* és *Escherichia coli* baktériumcsoportok PCR termékeinek relatív aránya a teljes vizsgált baktériumszámhoz képest a kontrollcsoport és a bioaktív növényi hatóanyagokkal beállított kezelések esetén a 7. ábrán láthatók.



a, b:  $p < 0,05$

7. ábra: A brojlercsirke bélsármintáiból meghatározott baktériumcsoportok PCR termékeinek relatív aránya

A baktériumcsoportok relatív arányai az említett csoportoknál a következőképp alakultak: A *Lactobacillusok* relatív aránya a kontrollcsoportnál 61,7%; a  $\beta$ -glükános kezelésnél 72,8%; a karotinoidos kezelésnél 53,3%; az oligoszacharidos kezelésnél 73,8%; az antocianinos kezelésnél 65,6% volt. A *Bifidobacteriumok* relatív aránya a kontrollcsoport esetén 10,6%, a  $\beta$ -glükános takarmánykiegészítés esetén 18,3%; a karotinoidos takarmánykiegészítés esetén 47%; az oligoszacharidos takarmánykiegészítés esetén 28,8%; az antocianinos takarmánykiegészítés esetén 49,3%

volt. A *Salmonella* relatív aránya a kontroll egyedeknél 30,8%; a  $\beta$ -glükán kezelésnél 46%, a karotinoidos kezelésnél 40,8%; az oligoszacharidos kezelésnél 38,6%; az antocianinos kezelésnél 47,5% volt. A *Campylobacter* nem volt kimutatható a mintákban. A *Clostridiumok* relatív aránya a kontrollcsoportnál 34,6%, a  $\beta$ -glükán-kiegészítés hatására 31,6%, a karotinoid-kiegészítés hatására 43,2%, az oligoszacharid-kiegészítés hatására 57,3%; az antocianin-kiegészítés hatására 66,2% volt. Az *Escherichia coli* aránya a kontrollcsoportnál 50,6%; a  $\beta$ -glükánnal kezelt egyedeknél 58%; a karotinoidokkal kezelt egyedeknél 54,5%; az oligoszacharidokkal kezelt egyedeknél 50,3%; az antocianinokkal kezelt egyedeknél 55,5% volt.

AMIT-ROMACH és mtsai (2004) tanulmányukban ugyanezt a módszert alkalmazták és a brojlercsirkék béltraktusában a mikrobiotát alkotó, bizonyos baktériumcsoportoknál a következő relatív arányokat határozták meg: a 14. napon a *Lactobacillusok* és a *Bifidobacteriumok* relatív aránya elérte a 40%-ot, míg a 25. napon a két nemzetség együttesen majdnem elérte a teljes baktériumszám felét. A 14. napon a *Salmonella* aránya 30% volt, míg a 25. napon ez az arány 20% alá csökkent. A *Campylobacter* nemzetség a 14. napon és a 25. napon csak egészen kis mennyiségben volt jelen. A *Clostridium* és az *E. coli* relatív arányai a teljes baktériumszámnak körülbelül 30-30%-a volt mindkét mintavételi időpontban.

A vizsgálataink során AMIT-ROMACH és mtsai (2004) eredményeihez hasonlítva az egyes kezeléseknél magasabb *Lactobacillus* és *Bifidobacterium* relatív arányokat határoztunk meg. A *Salmonella* relatív aránya hasonlóan alakult AMIT-ROMACH és mtsai (2004) 14. napi eredményeihez képest, egyes kezeléseknél ( $\beta$ -glükán, karotinoid, antocianin) meghaladta a 40%-os arányt. AMIT-ROMACH és mtsai (2004) eredményeinél a *Campylobacter* nyomokban volt jelen, míg méréseink során nem volt kimutatható. A *Clostridium* relatív arányai a kontrollcsoportnál és a  $\beta$ -glükán kezelésnél megegyeztek a referencia eredményeivel, míg a további kezeléseknél a baktériumcsoport relatív aránya meghaladta a 40%-ot (karotinoid), az 50%-ot (oligoszacharid) és a 60%-ot (antocianin) is. Az *E. coli* relatív arányait tekintve ugyancsak magasabb értékeket mértünk, mely minden kezelésnél elérte az 50%-ot.

Az eredményeink alapján megállapítható, hogy az alkalmazott bioaktív növényi hatóanyagok közül a karotinoidok és az antocianinok hatására növekedett a *Bifidobacteriumok* relatív aránya a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. A *Bifidobacteriumok* a *Lactobacillusokkal* együttesen a mikrobiota hasznos baktériumai, probiotikus baktériumok, melyek stimulálják más, a szervezet egészségi

állapotának szempontjából hasznos mikrobák növekedését, élettevékenységeit (LUCCHINI és mtsai, 1998; MIKKELSEN és mtsai, 2003). A karotinoidokról és az antocianinokról elmondható, hogy pozitív hatással lehetnek a mikrobiota bizonyos probiotikus baktériumainak, a *Bifidobacterium* nemzetség növelésére a csirkék béltraktusában, míg a  $\beta$ -glükán és az oligoszacharidok nem befolyásolták a *Bifidobacteriumok* relatív arányát.

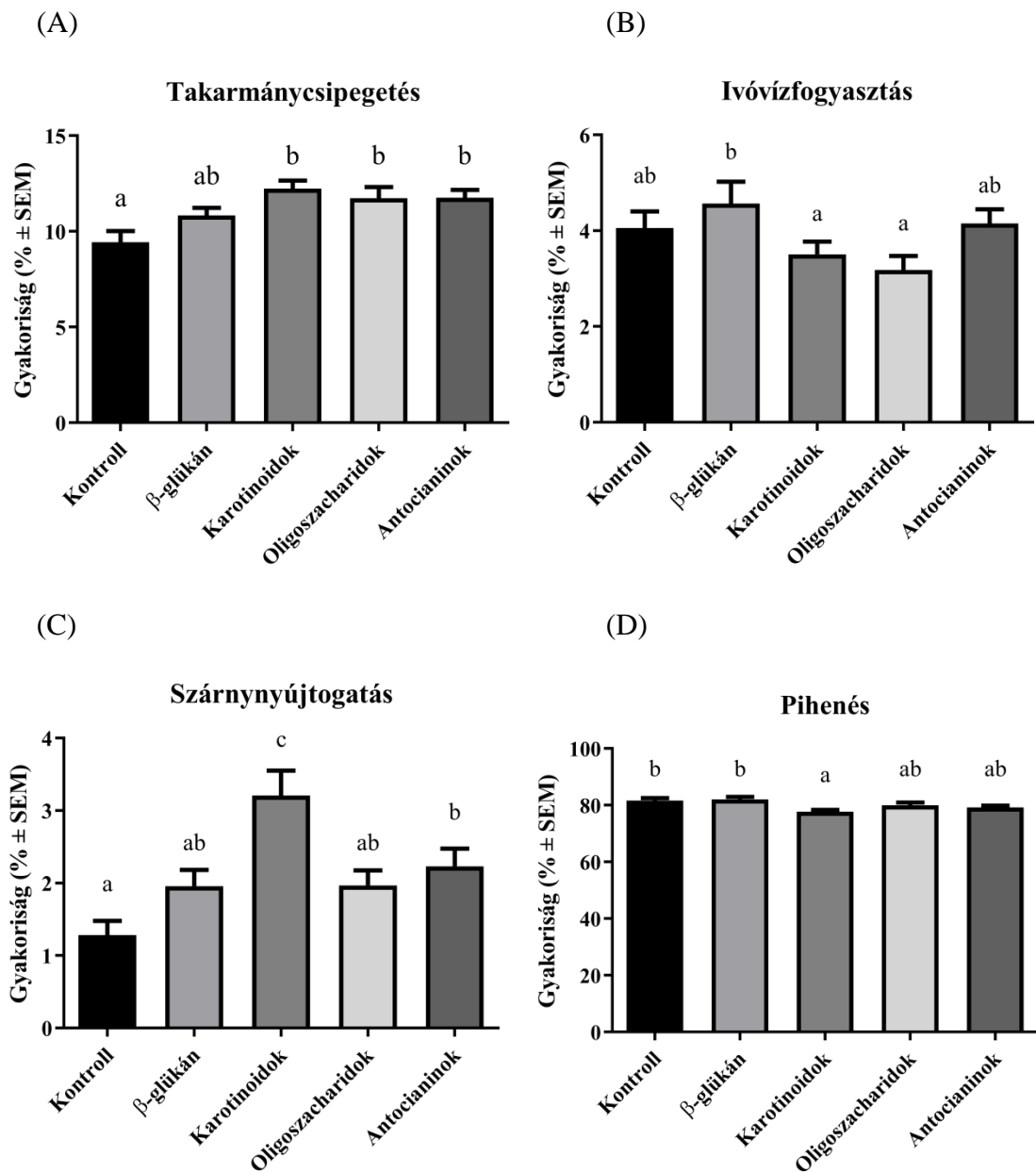
A kontroll valamint a  $\beta$ -glükán csoportokhoz képest az antocianinos kezelés hatására emelkedett a *Clostridium* nemzetség relatív aránya is. A *Clostridiumok*, ideértve a *C. perfringens*, szinte mindenhol megtalálhatók a környezetben, valamint a humán és az állati béltraktus mikrobiotájának jellemző alkotói (BRANDT és mtsai, 1999). Az oligoszacharidos kezelés hatására ugyancsak változatlan maradt a *Clostridiumok* relatív aránya.

Az egyes kezelések (karotinoidok, oligoszacharidok, antocianinok) hatására a *Lactobacillus*, a *Salmonella*, a *Campylobacter* és az *Escherichia coli* baktériumcsoportok relatív arányait tekintve nem tapasztaltunk változást a kontrollcsoporthoz képest.

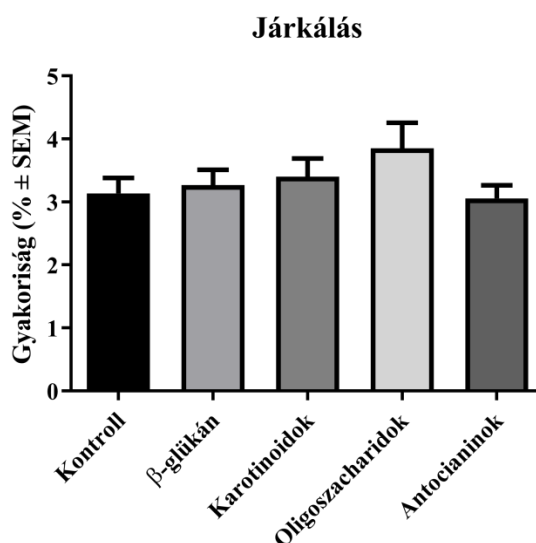
Mindezekkel egyezően, REZAEI és mtsai (2015) kísérletében ugyancsak változatlan eredményekről számoltak be a vakbélben meghatározott *Bifidobacteriumok*, *Lactobacillusok*, *Salmonella*, *Campylobacter* és *Escherichia coli* logaritmusos kópiáinak számát tekintve a kísérlet 21. és 35. napján, amikor takarmánykiegészítőként 0,5%-ban és 1%-ban pálmamagtrökölyből kivont oligoszacharidokat alkalmaztak.

### 5.1.5 A bioaktív hatóanyagok hatása a brojlercsirke viselkedésére

A 8. ábrán láthatók a brojlercsirke-viselkedés megfigyelésének eredményei a kontrollcsoport és a bioaktív növényi hatóanyagok hatására. A megfigyelt viselkedésminták a takarmánycsipegetésre és ivóvízfogyasztásra, komfortérzetet mutató szárnynyújtogatás tevékenységére, továbbá a járkálásra és pihenésre terjedtek ki.



(E)



a, b, c:  $p < 0,05$

**8. ábra: A brojlercsirke-viselkedés megfigyelésének eredményei a bioaktív növényi hatóanyagok hatására**

A brojlercsirke viselkedésének megfigyelése során a kontrollcsoportnál megfigyelt egyedek 9,4%-a, a  $\beta$ -glükános kezelésnél az egyedek 10,8%-a, a karotinoidos takarmánykiegészítés hatására az egyedek 12,2%-a, az oligoszacharidos kezelés hatására a megfigyelt egyedek 11,7%-a, valamint az antocianinos kiegészítésnél az egyedek 11,8%-a csipegette a takarmányt. A takarmánycsipegetés gyakoriságát a karotinoidos ( $p < 0,0001$ ), az oligoszacharidos ( $p = 0,0012$ ) és az antocianinos ( $p = 0,0011$ ) kezelés egyaránt növelte, míg a  $\beta$ -glükán hatására az említett viselkedésforma gyakorisága nem változott (8/A ábra).

Az ivóvízfogyasztást a karotinoidos ( $p = 0,0437$ ) és az oligoszacharidos ( $p = 0,027$ ) takarmánykiegészítés esetén figyeltük meg a legkevesebbszer a  $\beta$ -glükán csoporthoz mérten. A karotinoid-kiegészítésnél a megfigyelt egyedek 3,5%-a, míg az oligoszacharidos kezelésnél a megfigyelt egyedek 3,2%-a fogyasztott az itatóból. Az ivóvízfelvétel gyakorisága az egyes kezelések hatására változatlan maradt a kontrollcsoporthoz képest (8/B ábra).

A komfortérzetet jelző szárnynyújtogatás megfigyelésénél az adott viselkedésforma a karotinoidos takarmánykiegészítés esetén fordult elő a legtöbbször ( $p < 0,0001$ ), mely kezelésnél a megfigyelés idején az egyedek 3,2%-a nyújtogatta

a szárnyát. A karotinoidos kezelést az antocianinos takarmánykiegészítés követte ( $p = 0,0387$ ), ahol a megfigyelt madaraknak 2,2%-a nyújtózkodott. A legkevesebbszer a kontrollcsoport esetén számoltuk a szárnyak nyújtóztatását, melynek értéke 1,3% volt (8/C ábra).

A megfigyelés idején a brojlercsirkéknek körülbelül 77-82%-a pihent. A legtöbb pihenő madarat a kontrollcsoport (81,7%) és a  $\beta$ -glükános kezelés (82,1%) esetén, míg a legkevesebb ( $p = 0,0018$ ) pihenő madarat a karotinoidos kezelésnél (77,7%) számoltuk (8/D ábra). A brojlereknek körülbelül 3,1-3,8%-a járkált a megfigyelések során. A járkálás gyakoriságát egyik hatóanyag sem befolyásolta (8/E ábra).

EL IRAQI és FAYED (2012) kísérletükben az élesztőgomba (*Saccharomyces cerevisiae*) hatását vizsgálták a brojlerok viselkedésére nézve. Eredményeinkhez hasonlóan, a takarmánycsipegetést az élő és az inaktivált formában alkalmazott élesztőgomba nem befolyásolta. Vizsgálatuk során azonban a szárított élesztőt tartalmazó termék fokozta a táplálékfelvétel gyakoriságát, amit a szerzők a termékben jelenlévő vitaminok étvágyfokozó hatásával magyaráztak. Az ivás gyakorisága csökkent az élő, valamint a szárított élesztőgomba-hozzáadást követően, míg az inaktivált forma nem befolyásolta az említett tevékenységet a kontrollcsoportéhoz mérten. Megfigyeléseinkkel ellentétben, kísérletükben a komfortérzetre utaló szárny- és lábnyújtóztatás gyakorisága az élő és szárított élesztő hatására csökkent, míg az inaktivált forma nem befolyásolta az említett tevékenység előfordulásának gyakoriságát. A további komfortérzetet mutató tevékenységek közül a tollázkodás az inaktivált élesztő etetésének hatására fordult elő a legkevesebbszer, míg a legtöbb pihenő madarat szintén az említett kezelésnél számolták. A szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy az inaktivált élesztőt tartalmazó termék stimulálja a brojlerok immunitását és minimalizálja a stresszhatást. SYMEON és mtsai (2010) kísérletükben a csirkék takarmányához oregánóolajat adtak 100 és 250 mg/kg koncentrációban. A megfigyeléseik során mindkét koncentráció hatására csökkent az etetővályúk és az itatók felkeresése, valamint a mozgás tevékenységének gyakorisága. Mindezt a szerzők az illóolaj nemkívánatos ízével/illatával indokolták, továbbá azzal, hogy a madaraknál az evés és ivás gyakorisága között egyenes arányosság áll fenn.

Megfigyeléseink során a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok is növelték a takarmánycsipegetés gyakoriságát, így az említett bioaktív hatóanyagok

valószínűleg nem rendelkeznek rossz ízzel/illattal. A karotinoidok és az oligoszacharidok hatására a várthoz képest változatlan maradt az ivóvízfogyasztás. A szárnynyújtogatás a karotinoidok hatására gyakoribb volt, ami összefüggésben lehet az említett hatóanyag lehetséges immunstimuláló és stresszhatást csökkentő tulajdonságával. A legtöbb pihenő egyed a kontrollcsoportnál és a  $\beta$ -glükán kezelésnél számoltuk, ami szintén mutathatja az említett kezelés stresszhatást minimalizáló tulajdonságát.

## 5.2 A ponttyal végzett vizsgálatok eredményei

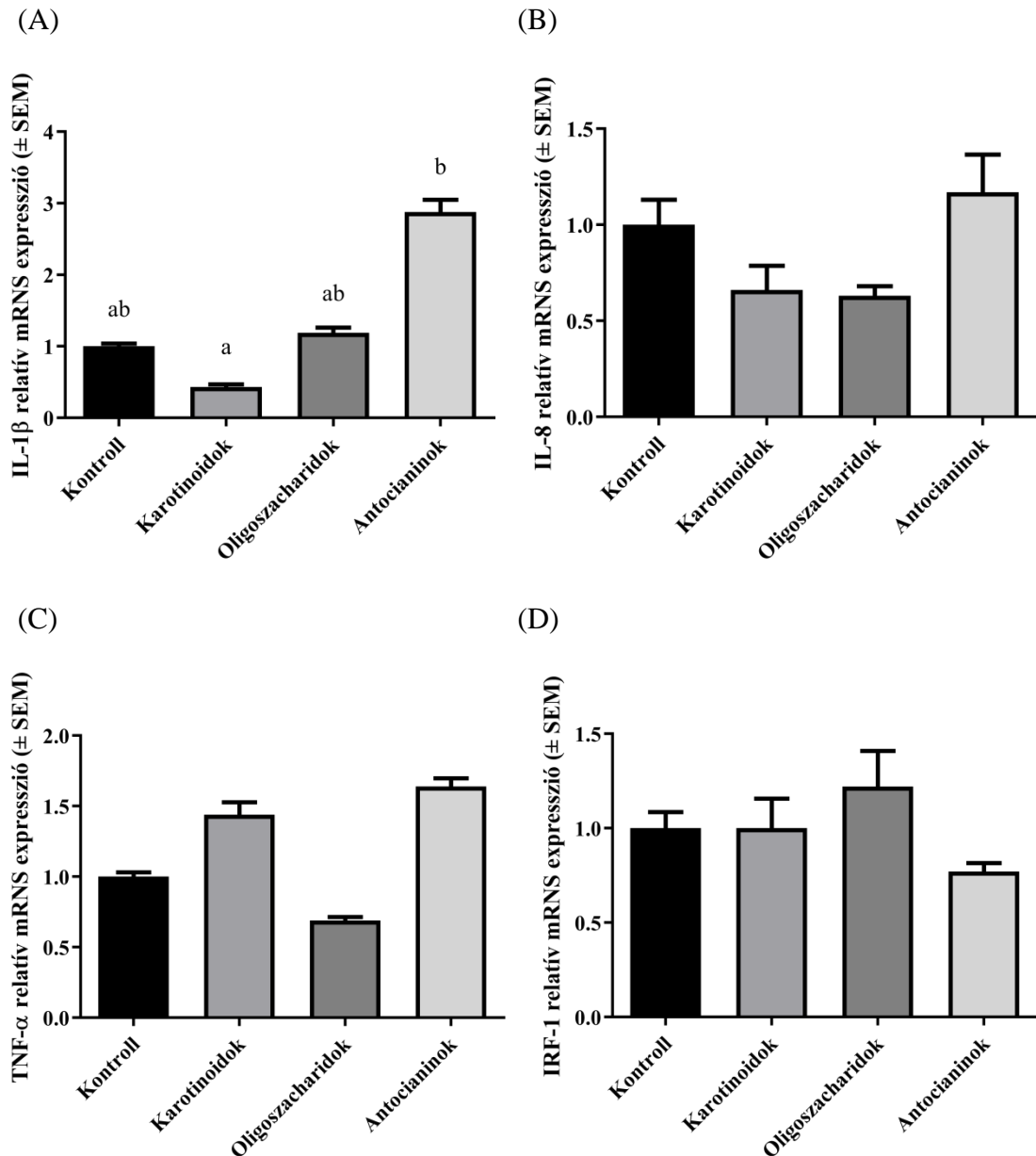
### 5.2.1 A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a ponty immunológiai paramétereire

A ponty *IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *TNF- $\alpha$*  és *IRF-1* mRNS expressziója a lépben az 9. ábrán látható.



9. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a ponty citokinek relatív génexpressziójára a lépben

A Ct-értékek (átlag  $\pm$  szórás) az egyes citokinek esetén a következőképpen alakultak: *IL-1 $\beta$* :  $26,457 \pm 1,494$ ; *IL-8*:  $26,945 \pm 0,985$ ; *TNF- $\alpha$* :  $35,209 \pm 1,157$ ; *IRF-1*:  $24,743 \pm 1,150$ ; mely értékek jelzik az mRNS expressziót a lépben mind a kontrollcsoport, mind a kezelések esetén. Megállapítható, hogy sem a karotinoidok, sem az oligoszacharidok, sem pedig az antocianinok nem befolyásolták a pontynál a lépben vizsgált citokinek génexpressziós szintjét.



a, b:  $p < 0,05$

10. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a ponty citokinek relatív génexpressziójára a középbelben

A ponty *IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *TNF- $\alpha$*  és *IRF-1* génexpressziós szintje a középbelben az 10. ábrán olvasható. A Ct-értékek (átlag  $\pm$  szórás) az egyes citokinek esetén a középbelben a következőképpen alakultak: *IL-1 $\beta$* :  $35,773 \pm 1,504$ ; *IL-8*:  $25,498 \pm 0,698$ ; *TNF- $\alpha$* :  $33,313 \pm 1,038$ ; *IRF-1*:  $24,337 \pm 2,278$ , mely értékek jelzik a citokinek mRNS expresszióját. A léphez hasonlóan, a középbelben vizsgált citokinek génexpressziós szintjére sem gyakoroltak hatást az egyes növényi hatóanyagok.

A takarmányban 1%-ban alkalmazott karotinoidok, oligoszacharidok és antocianinok hatását a ponty citokinjeinek génexpressziós szintjeire nézve ugyancsak meghatároztuk. A karotinoidok alkalmazását követően a lépben és ileumban vizsgált interleukin-1 $\beta$ , interleukin-8, tumor nekrosis faktor- $\alpha$  és interferon szabályozó faktor-1 génexpressziós szintjeire az említett növényi kivonat nem volt hatással a kontrollcsoportéhoz képest. A karotinoidos etetés hatására egyetlen esetben találtunk különbséget, amikor az ileumban mért gyulladáskeltő *IL-1 $\beta$*  génexpressziós szintje csökkent az antocianinos kezeléshez mérten (10/A ábra). LI és mtsai (2019) ugyancsak az *IL-1 $\beta$*  és a *TNF- $\alpha$*  proinflammatorikus citokinek csökkenő génexpressziós szintjéről számoltak be. Tanulmányukban az északi kígyófej (*Channa argus*) etetésénél a karotinoidokhoz sorolható asztaxantint alkalmaztak 50, 100 és 200 mg/ttkg-os koncentrációban, valamint a kísérlet során a halaknál LPS-indukálást alkalmaztak. Mivel az asztaxantin gátolta a gyulladásos citokinek kifejeződését, a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a karotinoid komponens képes csökkenteni a gyulladásos immunválaszt.

A kísérleteink során alkalmazott oligoszacharidok nem befolyásolták a pontynál mért citokinek mRNS expresszióját. YOUSEFI és mtsai (2018) a galakto-oligoszacharidok hatását vizsgálták 0,5, 1 és 2%-ban a takarmányban a zebrahal (*Danio rerio*) veleszületett immunparamétereire vetítve. Az eredményeinkhez hasonlóan, a szerzők nem tapasztaltak különbséget az 1 és 2%-os takarmánykiegészítés hatására az sem az *IL-1 $\beta$*  mRNS szintjében, valamint a 2%-os kiegészítés következményeként a *TNF- $\alpha$*  mRNS szintjében sem. Ezzel ellentétben, a 0,5%-os galakto-oligoszacharid kiegészítés szignifikánsan csökkentette az *IL-1 $\beta$*  mRNS szintet. A *TNF- $\alpha$*  mRNS szintje nőtt azoknál a kezeléseknél, melyek a galakto-oligoszacharidokat 0,5 és 1%-ban tartalmazták. Következtetésképpen, a szerzők úgy vélték, hogy a prebiotikumok befolyásolhatják az immunparamétereket és az azokhoz kapcsolódó gének expressziós

szintjét, ezáltal a galakto-oligoszacharidok lehetséges immunmoduláns hatással rendelkezhetnek molekuláris szinten (YOUSEFI és mtsai, 2018).

Az antocianinokkal 1%-ban kiegészített takarmány hatását ugyancsak megvizsgáltuk a ponty bizonyos immunfaktorainak mRNS szintjére nézve, ám az említett hatóanyagok nem befolyásolták a citokinek génexpresszióját. Ehhez hasonlóan, Yilmaz és mtsai (2019b) mérései során a lépben mért *IL-8* génexpressziós szintje változatlan maradt, amikor magas antocianin-tartalmú szederszirupot adtak a nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) takarmányához 7,5, 15 és 30 g/kg koncentrációban. Eredményeinkkel ellentétben, a szerzők a 7,5 g/kg-os szederszirupos kiegészítés hatására azonban az *IL-1 $\beta$*  és *TNF- $\alpha$*  szintjének növekedését figyelték meg a lépben, ezáltal arra a következtetésre jutottak, hogy a szederszirup fokozza a veleszületett immunrendszer alkotóinak termelődését, valamint az immunrendszer fejlődését. Yilmaz és mtsai (2019a) kísérletük során 40, 80 és 160 mg/kg koncentrációban antocianinokkal egészítették ki a takarmányt, aminek hatására növekedett az *IL-1 $\beta$*  mRNS szintje. A 20, 40, 80 és 160 mg/kg antocianin-kiegészítés hatására az *IL-8* és *TNF- $\alpha$*  is magas génexpressziós szintet ért el.

Az általunk vizsgált növényi kivonatok közül egyik sem befolyásolta a lép (9/D ábra) és a középbélszakasz (10/D ábra) *IRF-1* mRNS szintjét. Ezzel egyezően, TEROVA és mtsai (2016) sem találtak különbséget az európai tengeri sügér (*Dicentrarchus labrax*) *IRF-1* mRNS szintjénél.

### 5.2.2 A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a ponty intesztinális morfológiájára

A középbélben mért morfológiai paraméterek eredményeit a 11. táblázat foglalja össze. A morfometriai tulajdonságok közül a villusok hosszát és szélességét, valamint az izomréteg vastagságát határoztuk meg és az alábbi eredményeket kaptuk: a villusok hossza nem változott a karotinoidokkal és az oligoszacharidokkal kiegészített takarmányetetés hatására a kontrollcsoporthoz képest. A kontroll halakhoz hasonlítva rövidebb villusokat ( $p = 0,0203$ ) mértünk az antocianinos kezelés hatására. A villusszélességet tekintve a legszélesebb méretet a kontrollcsoportnál kaptuk, ehhez mérten a karotinoidok ( $p < 0,0001$ ), az oligoszacharidok ( $p = 0,0004$ ) és az antocianinok ( $p = 0,0005$ ) hatására keskenyebb villusokat határoztunk meg. A pontyok bélfalizomrétegének vastagsága a karotinoidos, valamint oligoszacharidos kezelés hatására változatlan maradt, míg az antocianinos kiegészítés hatására a bélfal izomréteg-vastagság csökkent ( $p = 0,0397$ ) a kontrollcsoport egyedeihez képest.

A magasabb és szélesebb villusok nagyobb felülettel rendelkeznek, ezáltal teszik hatékonyabbá a tápanyagfelszívódást (HEIDARIEH és mtsai, 2013). Bizonyos komponensek, mint például a különféle oligoszacharidok az enterociták által fokozhatják a mucos szekrécióját is, ami az emésztés viszkozitását javíthatja (TORRECILLAS és mtsai, 2011). Az utóbbi növelése stimulálhatja a bélfal izomrétegének fejlődését (YUJI-SADO és mtsai, 2015).

A villusok hosszát tekintve a legmagasabb bélbolyhokat a kontrollcsoportnál, valamint a karotinoidos és az oligoszacharidos kezelés hatására kaptunk, míg az antocianinos kezelés eredményeként rövidebb villusokat mértünk. A legszélesebb bélbolyhokat a kontrollcsoportnál tapasztaltuk, ehhez képest a takarmánykiegészítés hatására keskenyebb villusokat figyeltünk meg. A kontrollcsoportnál és az oligoszacharidos kezelésnél vastagabbnak bizonyult az izomréteg az antocianinos kezeléshez képest.

A ponty intesztinális morfológiai paramétereinek eredményei

Morfológiai paraméter	Kezelések				<i>p</i> -érték
	Kontroll	Karotinoidok	Oligoszacharidok	Antocianinok	
Villushossz (μm)	360,74±2,52 <sup>b</sup>	372,88±4,32 <sup>b</sup>	379,93±3,66 <sup>b</sup>	338,20±3,13 <sup>a</sup>	<i>p</i> < 0,0001
Villusszélesség (μm)	44,62±0,88 <sup>b</sup>	38,62±0,54 <sup>a</sup>	40,74±0,78 <sup>a</sup>	40,80±0,63 <sup>a</sup>	<i>p</i> < 0,0001
Izomréteg-vastagság (μm)	47,96±0,42 <sup>b</sup>	45,52±0,69 <sup>ab</sup>	48,18±0,51 <sup>b</sup>	44,91±1,01 <sup>a</sup>	<i>p</i> = 0,0048

a, b = Soronként az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek.

Az eredmények átlag ± SEM értékekben jelennek meg.

Az eredményeinkhez hasonlóan, a vörös árnyékhal (*Sciaenops ocellatus*) különböző bélszakaszaiban a villusok hossza változatlan maradt a frukto-oligoszacharidok, a galakto-oligoszacharidok, a mannán-oligoszacharidok és galakto-glüko-mannánok (10-10 g/kg) hatására is (ZHOU és mtsai, 2010).

YUJI-SADO és mtsai (2015) szintén a bélfal izomrétegének vastagságát vizsgálták a nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) esetén. A kísérletükben 30 és 60 napon keresztül 0,2, 0,4 és 0,6%-ban mannán-oligoszacharidokat alkalmaztak. A méréseik során a 30. napon gyűjtött mintáknál csupán a 0,2%-os kiegészítés hatására maradt változatlan, míg a 60. napon gyűjtött mintáknál egyik koncentráció hatására sem különbözött a bélfal izomrétegének vastagsága.

Az eredményeinkkel ellentétben, SAMAVAT és mtsai (2019) 12,5 és 25 mg/kg-ban flavonoidokat tartalmazó grapefruit kivonattal kiegészített takarmány hatására hosszabb és szélesebb villusokat mértek a gyöngyös koncér (*Rutilus frisii kutum*) elülső bélszakaszában. YUJI-SADO és mtsai (2015) ugyancsak hosszabb bélbolyhokat figyeltek meg a nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) elülső béltraktusában, amikor 30 napon keresztül 0,2 és 0,4% mannán-oligoszacharid kiegészítést alkalmaztak. A kísérlet 30. napján a 0,4%-os mannán-oligoszacharid kiegészítés hatására a bélfal izomrétegének vastagsága is nőtt. A kísérletet tovább folytatták, azonban a 60. napon már egyik paraméternél sem tapasztaltak különbséget.

Következtetésként elmondható, hogy a táplálóanyag-felszívódás a kontrollcsoport esetén lehet a leghatékonyabb, míg az emészthetőség szempontjából az antocianinos kezelésnél hátrányt jelenthetnek a rövidebb és keskenyebb villusok, valamint a kisebb bélfal izomréteg-vastagság.

## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Kutatásunk során különféle bioaktív növényi hatóanyagok (karotinoidok, oligoszacharidok, antocianinok) hatását vizsgáltuk a brojlercsirke immunológiai és intesztinális morfológiai paramétereire, a bél-mikrobiota összetételére, valamint a viselkedésre és az alábbi következtetéseket vontuk le:

Az általunk alkalmazott karotinoidok, oligoszacharidok és antocianinok nem befolyásolták a 42 napos brojlercsirkék élősúlyát, továbbá változatlan maradt az átlagos napi súlygyarapodás is. A hatóanyagok közül a  $\beta$ -glükán kezelés (83 g/nap/madár), az oligoszacharidos kiegészítés (82 g/nap/madár) és az antocianinos kiegészítés (88 g/nap/madár) hatására nőtt az átlagos napi takarmányfelvétel a kontrollcsoportéhoz képest (73 g/nap/madár).

Az alkalmazott bioaktív anyagok részben kedvezően befolyásolták a brojlercsirke sejtes immunválaszában szerepet játszó, gyulladásos paraméterek mRNS szintjét. A karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok csökkentették a lépben mért proinflammatorikus interleukin-1 $\beta$  mRNS-expressziót, továbbá a karotinoidok hatására a gyulladáskeltő interleukin-6 génexpressziója is csökkent a lépben. Ezen eredmények alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy az alkalmazott karotinoidok, oligoszacharidok és antocianinok képesek lehetnek a gyulladáskeltő citokinek kifejeződését gátolni, ezáltal csökkenthetik a gyulladás mértékét. Ebből adódóan, a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok a sejtes immunválasz potenciális immunmodulátorai lehetnek. A pozitív kontrollként alkalmazott  $\beta$ -glükán-kiegészítés hatására a toll-like receptor 5 mutatott alacsony génexpressziót az antocianinokkal kezelt egyedekhez képest, mely a mikrobiota hasznos baktériumainak növekedésével és a patogének csökkenő kolonizációjával hozható összefüggésbe.

Azon citokineknél, melyeknél mRNS szinten változást tapasztaltunk, a bioaktív növényi hatóanyagok hatását fehérjeszinten is megvizsgáltuk. Eredményeink alapján az IL-1 $\beta$  és IL-6 fehérjéknél a kezelések hatására nem tapasztaltunk változást, amely több tényező függvénye is lehet. Az mRNS- és fehérje-expresszió közötti különbségeket okozhatják az mRNS poszt-transzkripcióos folyamatai, a fehérjék különböző fél-életideje.

A bioaktív növényi hatóanyagok hatásának vizsgálatát elvégeztük a brojlercsirke vérplazma IgG szintjére is, melynél az alábbi következtetéseket vontuk le: a kezelések közül a pozitív kontroll ( $\beta$ -glükán) csoport és az oligoszacharidok hatására nőtt

a vérplazmában az IgG koncentráció, ezáltal a  $\beta$ -glükán és az oligoszacharidok fokozhatják a humorális immunválasz kialakulását. Az IgG a madaraknál az elsődleges antitest-válasz során – az IgM után – termelődik, a másodlagos antitest-válasz során pedig elsődleges izotípus. Ez alapján megállapítható, hogy a  $\beta$ -glükán és az oligoszacharidok humorális immunfunkciót javító hatással bírhatnak. Érdekesnek tartjuk a madaraknál jellemző, más immunoglobulinok (IgM, IgA) vizsgálatát is, annak érdekében, hogy az alkalmazott bioaktív hatóanyagok humorális immunválaszra kifejtett hatásáról további információkkal rendelkezünk.

Megvizsgáltuk a  $\beta$ -glükán, a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok hatását a csirkebél morfológiai paramétereire is, melynél az alábbi eredményeket kaptuk. A kezelések pozitív hatást gyakoroltak a brojlercsirke ileum (csípőbél) morfológiájára, ugyanis a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok egyaránt növelték a villusok hosszát; a  $\beta$ -glükán és az antocianinok hatására nagyobb volt a villushossz:kriptamélység aránya; a teljes bélnyálkahártyaréteg pedig a  $\beta$ -glükán, az oligoszacharidok és az antocianinok hatására is vastagabb lett. Ebből adódóan, a felhasznált növényi hatóanyagok növelték a brojlercsirkénél a táplálóanyagok felszívódására rendelkezésre álló felületet, ezáltal a vizsgált hatóanyagok javíthatják az emésztési funkciókat és kedvező hatást gyakorolhatnak a táplálóanyag-felszívódásra. Fontosnak tartjuk a vékonybél további szakaszainak (duodenum, jejunum) morfológiai vizsgálatát, annak érdekében, hogy a lehetséges pozitív morfológiai változásokat a teljes vékonybéltraktusra vetítve tudjuk megállapítani.

A növényi eredetű bioaktív anyagok hatására a brojlercsirke bél-mikrobiota összetételében bekövetkező változásokat meghatározva arra a következtetésre jutottunk, hogy a vizsgált *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Salmonella* és *Escherichia coli* baktériumcsoportok közül a karotinoidok és az antocianinok hatására növekedett a *Bifidobacteriumok* relatív aránya. A *Bifidobacterium* nemzetség a hasznos mikrobákhoz sorolható, a béltraktus probiotikus baktériumai közé tartoznak és más előnyös mikrobák élettevékenységét fokozzák. Szerepük van továbbá a bél mikrobiális egyensúlyának fenntartásában. Ebből adódóan, a karotinoidok és az antocianinok kedvező hatása a mikrobiota kialakulása során is megjelenhet és az említett hatóanyagoknak fontos szerepe lehet a béltraktus mikrobiális egyensúlyának fenntartásában.

Megfigyeltük, hogy az alkalmazott növényi hatóanyagok miként hatnak a brojlerek viselkedésére, melynek során arra a következtetésre jutottunk, hogy a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok egyaránt fokozták a takarmánycsipegetés gyakoriságát. Ebből adódóan, a felhasznált növényi kivonatok valószínűleg nem rendelkeznek rossz ízzel/illattal. A komfortérzetre utaló szárnynyújtogatás tevékenysége a karotinoidos és az antocianinos kezelés hatására volt a leggyakoribb, ami utalhat az említett hatóanyagok lehetséges immunmoduláló és stresszhatást csökkentő hatására. A pihenés tevékenységének megfigyelése során a legtöbb pihenő madarat a kontrollcsoportnál és a  $\beta$ -glükán kezelésnél számoltuk, ami ugyancsak mutathatja az említett hatóanyag stresszhatást csökkentő tulajdonságát.

Az alkalmazott karotinoidok, oligoszacharidok és antocianinok hatásának vizsgálatát elvégeztük a ponty immunológiai és intesztinális morfológiai paramétereire nézve is, melynek során az alábbi következtetéseket vontuk le: megállapítottuk, hogy sem a karotinoidok, sem az oligoszacharidok, sem pedig az antocianinok nem gyakoroltak hatást a specifikus immunrendszer részeként a sejtes immunválaszban szerepet játszó citokinek (*IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *TNF- $\alpha$* , *IRF-1*) mRNS szintjére. Fontosnak tartjuk ezért a ponty immunválasza során jellemzően jelen lévő, egyéb immunfaktorok (például lizozim-C, TGF- $\beta$ , NF- $\kappa$ B útvonal) génexpressziójának, valamint a humorális immunitásban szerepet játszó, a pontynál jellemző immunoglobulinok (IgM vagy IgD) vizsgálatát.

A karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok hatását a ponty intesztinális morfológiai tulajdonságaira nézve ugyancsak meghatároztuk, mely során a középbél középső szegmensét vizsgáltuk. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a karotinoidok és oligoszacharidok hatására nem változott, míg az antocianinok hatására csökkent a villusok hossza. A bélbolyhok szélessége a kontrollcsoporthoz képest a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok hatására is keskenyebb volt. A bélfal izomrétegének mérése során a karotinoidok és az oligoszacharidok hatására nem változott, míg az antocianinok hatására csökkent az izomréteg vastagsága. Ebből adódóan, az alkalmazott hatóanyagoknak a középbél morfológiai képleteire kifejtett kedvező hatását a pontynál nem sikerült kimutatnunk. További eredmények érdekében fontosnak véljük más bélszakaszok (előbél, utóbél) morfológiai vizsgálatát is elvégezni.

## 7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

A karotinoidoknak, az oligoszacharidoknak és az antocianinoknak a brojlercsirke immunológiai és intesztinális morfológiai paramétereire, a bél-mikrobiotára, valamint a ponty immunológiai és intesztinális morfológiai paramétereire gyakorolt hatásának vizsgálata során az alábbi új tudományos eredmények születtek:

1. Az alkalmazott karotinoidok, oligoszacharidok és antocianinok nem gyakoroltak hatást a brojlercsirkék élősúlyára, valamint a napi súlygyarapodásra. A kontrollcsoporthoz képest (73 g/nap/madár) a  $\beta$ -glükán-kiegészítés (83 g/nap/madár), az oligoszacharidok (82 g/nap/madár) és az antocianinok (88 g/nap/madár) is növelték a napi takarmányfelvételt.
2. Megállapítottam, hogy a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok potenciális immunmodulátorok lehetnek a brojlercsirke gyulladással járó immunválaszának kialakulása során, miután a proinflammatorikus *IL-1 $\beta$*  mRNS szintjét a lépben mindhárom hatóanyag csökkentette. A karotinoidok 80%-kal, az oligoszacharidok 70%-kal, az antocianinok 80%-kal alacsonyabb *IL-1 $\beta$*  génexpressziós szintet eredményeztek. A karotinoidok hatására 80%-kal csökkent a gyulladáskeltő *IL-6* mRNS szintje is.
3. A  $\beta$ -glükán és az oligoszacharidok a brojlercsirke humorális immunitását javító funkcióval bírhatnak, miután hatásukra a vérplazma IgG szintje magasabb lett (252,1 ng/ml és 253,5 ng/ml) a kontrollcsoporthoz (196,4 ng/ml) képest.
4. A  $\beta$ -glükán 22%-kal, a karotinoidok 14%-kal, az oligoszacharidok 20%-kal és az antocianinok 16%-kal növelték a brojlercsirke bélbolyhainak hosszát. A  $\beta$ -glükán (8,57) és az antocianinok (7,12) növelték a villushossz:kriptamélység arányait a kontroll egyedekhez (5,83) képest. A  $\beta$ -glükán és az oligoszacharidok hatására 14-14%-kal, az antocianinok hatására 11%-kal vastagabb lett a bélnyálkahártyaréteg is. Az alkalmazott hatóanyagok pozitív hatással lehetnek a brojlercsirkék táplálóanyag felszívódására.

5. Megállapítottam, hogy a karotinoidok és az antocianinok előnyös hatással lehetnek a brojlercsirke bél-mikrobiota összetételére, miután az említett takarmánykiegészítők majdcsak 40%-kal növelték a *Bifidobacteriumok* relatív arányát.
6. Az alkalmazott hatóanyagok a brojlerek viselkedését is befolyásolták, miután a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok is növelték a takarmánycsipegetés gyakoriságát, valamint az karotinoidok és az antocianinok hatására a komfortérzetet jelző szárnynyújtogatás tevékenysége is gyakrabban előfordult.
7. A karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok lehetséges immunmoduláló hatását a pontynál nem figyeltem meg. A felsorolt hatóanyagoknak a ponty bélmorfológiai paramétereire kifejtett kedvező hatását sem sikerült kimutatni.

## 8. GYAKORLATBAN ALKALMAZHATÓ EREDMÉNYEK

A dolgozat eredményei alapján az egyes növényi eredetű, bioaktív hatóanyagokról megállapítható, hogy milyen kedvező hatást gyakorolhatnak a termelésre:

1. A  $\beta$ -glükán pozitívan hathat a táplálóanyag-felszívódásra, továbbá a humorális immunitás szempontjából is potenciális immunstimulátor lehet.
2. A kutatás során vizsgált *karotinoidek* a brojlercsirkénél akutfázis válaszreakción keresztül képesek a gyulladási reakciók csökkentésére és a sejtes immunválasz potenciális immunmodulátorai lehetnek. Alkalmazásuk javasolt a táplálóanyag-felszívódás javításának szempontjából is. A brojlerek béltraktusában a *Bifidobacterium* nemzetség növelésével az megfelelő mikroflóra egyensúlyának kialakulásához is hozzájárulhat.
3. Az alkalmazott, magas *arabino-galaktóz tartalmú oligoszacharidok* (prebiotikumok) felhasználása javasolt a tyúk gyulladási faktorainak enyhítése, ezáltal a sejtes immunválasz, valamint a humorális immunválasz fokozásának céljából. Az említett hatóanyag a bél morfológiai paraméterek közül a villusok hosszának, valamint a bélnyálkahártyaréteg vastagságának növekedését is elősegítheti.
4. A vizsgálatok során felhasznált *antocianinok* a brojlerek esetén gyulladáscsökkentő szereppel rendelkezhetnek, mindemellett pozitív hatással lehetnek a bél morfológiai tulajdonságaira, továbbá pozitív hatást gyakorolhatnak a bél-mikrobiota kedvező baktériumainak (*Bifidobacteriumok*) arányára.

## 9. ÖSSZEFOGLALÁS

Az állatgyógyászati célból felhasznált antibiotikumok szerepe jelentős, ám nem megfelelő alkalmazásuk egyre nagyobb aggályt jelent az antibakteriális szerekre rezisztens patogének miatt. Ezáltal, számos kutatás irányul olyan természetes eredetű alternatívák vizsgálatára, amelyek természetes úton segíthetik a gazdasági haszonállatok védekezőképességének kialakulását. Ilyen természetes hatóanyagok lehetnek többek között az antioxidánsok, a pro- és a prebiotikumok, valamint az immunstimuláló növényi kivonatok. Kutatásunk során célul tűztük ki a *karotinoidok*, az *oligoszacharidok* és az *antocianinok* lehetséges immunmoduláló, továbbá az intesztinális morfológiára és mikrobiotára kifejtett hatásának vizsgálatát a brojlercsirke esetén. A hatóanyagok immunológiai, továbbá a bélmorfológiai paraméterekre gyakorolt hatásának vizsgálatát a ponty esetén is elvégeztük.

A brojlerkísérlet beállítása Ross 308 genotípusú brojlercsirkékkel történt, ahol a kontrollcsoporton kívül kialakításra került egy pozitív kontrollcsoport is, melynél a bizonyítottan immunmoduláns hatással rendelkező  $\beta$ -glükánt 0,05%-ban alkalmaztuk takarmánykiegészítőként. A további kezelések a karotinoidokat, az oligoszacharidokat és az antocianinokat 0,5%-ban tartalmzták. A kísérlet ideje 42 napig tartott. A felhasznált bioaktív anyagok nem gyakoroltak hatást 42 napos korban a brojlercsirkék élősúlyára, valamint nem befolyásolták az átlagos napi súlygyarapodást sem. A  $\beta$ -glükán, az oligoszacharid és az antocianin-kiegészítés a hizlalási időszakban növelte az átlagos napi takarmányfelvételt.

A bioaktív növényi hatóanyagok immunmoduláló hatását génexpressziós vizsgálatok keretében, qPCR módszerrel, a lépben és csípőbélben mRNS szinten határoztuk meg a celluláris immunválaszban szerepet játszó interleukin- $1\beta$  (*IL-1 $\beta$* ), az interleukin-6 (*IL-6*), az interferon- $\alpha$  (*IFN- $\alpha$* ), az interferon- $\gamma$  (*IFN- $\gamma$* ) citokinek, valamint a toll-like receptor 4 (*TLR-4*) és a toll-like receptor 5 (*TLR-5*) esetén. A felsorolt citokinek és receptorok közül a proinflammatorikus *IL-1 $\beta$*  mRNS szintje csökkent a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok hatására is, továbbá az ugyancsak gyulladáskeltő *IL-6* génexpressziós szintje is alacsonyabb lett a karotinoidos kezelés esetén. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a felsorolt növényi kivonatok a gyulladáskeltő citokinek kifejeződését gátolhatják, ezáltal pozitív szerepük lehet a gyulladással immunválasz kialakulása során. Mivel

a citokinek a sejtes immunválasz szignál fehérjéi, az említett hatóanyagok a celluláris immunitás potenciális immunmodulátorai lehetnek.

A lehetséges immunstimuláns hatást fehérjeszinten, szendvics ELISA módszer segítségével is megvizsgáltuk az IL-1 $\beta$  és az IL-6 citokinek, valamint a humorális immunválaszban részt vevő IgG esetén. Az ELISA mérések alapján a két citokin esetén eltérő fehérje-expressziót határoztunk meg a génextpressziós eredményekhez képest, melynek különféle poszt-transzkripciós okai lehetnek, valamint a fehérjék különböző fél-életidejével is magyarázhatók. A vérplazma IgG koncentrációja a  $\beta$ -glükán és az oligoszacharidok hatására is emelkedett, ezáltal mindkét hatóanyagoknak szerepe lehet a brojlercsirkék humorális immunitásának fokozásában.

A munkánk során választ kerestünk arra is, hogy az alkalmazott bioaktív anyagok miként gyakorolhatnak hatást a brojlerek béltraktusának morfológiájára, ezáltal hogyan befolyásolják a táplálóanyagok felszívódását. Ezeket a méréseket a csípőbél hátsó szakaszában végeztük, melynél a szöveti metszetek hematoxilin-eozin festést követően, mikroszkópi kamerával készített fotók segítségével kerültek tanulmányozásra. Méréseink során arra jutottunk, hogy a  $\beta$ -glükán, a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok egyaránt növelték a bélbolyhok hosszát. A  $\beta$ -glükán és az antocianinok hatására nagyobb lett a villushossz:kriptamélység aránya, valamint a  $\beta$ -glükán, az oligoszacharidok és az antocianinok is növelték a mucosa rétegének vastagságát. Az eredmények arra engednek következtetni, hogy az alkalmazott bioaktív anyagok növelték a táplálóanyag-felszívódásra rendelkezésre álló felületet, ezáltal előnyös hatást gyakorolhatnak az emésztési funkciókra.

Kutatásunk során megvizsgáltuk a növényi hatóanyagok hatását a brojlerek bél-mikrobiota összetételére nézve is. A 16S rDNS-re tervezett primerpárok segítségével, PCR technikával és agaróz gélelektroforézissel a *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Salmonella* és *Escherichia coli* baktériumcsoportok relatív arányait mértük meg. A DNS vizsgálatok során megállapítottuk, hogy a karotinoidok és az antocianinok is növelték a *Bifidobacteriumok* relatív arányát, ezáltal fontos szerepük lehet a bél mikrobiális egyensúlyának fenntartásában.

Megvizsgáltuk továbbá az alkalmazott hatóanyagok hatását a brojlerek viselkedésére is, melynél azt tapasztaltuk, hogy a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok hatására gyakoribbá vált a takarmánycsipegetés, ami jelezheti, hogy a felsorolt hatóanyagok nem rendelkeznek kellemetlen ízzel/illattal. Az ivóvízfogyasztás gyakorisága az egyes kezelések hatására nem változott.

A karotinoidok és az antocianinok hatására többször figyeltük meg a szárnynyújtogató tevékenységét is, ami a madarak komfortérzetére és a felsorolt hatóanyagok lehetséges stresszhatást csökkentő tulajdonságára utalhatnak.

A halakkal végzett kísérletet egynyaras pontyokkal állítottuk be. A kontrollcsoporton kívül az egyes kezelések a karotinoidokat, az oligoszacharidokat és az antocianinokat tartalmazták 1%-ban. A kísérlet ideje 6 hétig tartott, a mintavétel a 6. héten történt. Az alkalmazott hatóanyagok lehetséges immunstimuláns hatását ugyancsak génexpressziós vizsgálatokkal végeztük a lépben és a béltraktus középső szakaszában az *IL-1 $\beta$* , az *IL-8*, a *TNF- $\alpha$*  és az *IRF-1* citokinekénél. A vizsgálatok során arra a következtetésre jutottunk, hogy az alkalmazott hatóanyagok nem gyakoroltak hatást sem a lépben, sem a bélszakaszban mért citokinek mRNS szintjére. A béltraktusban mért *IL-1 $\beta$*  génexpressziós szintje a karotinoidok hatására csökkent, az antocianinos kezeléshez képest.

A bioaktív növényi hatóanyagok hatásának vizsgálatát elvégeztük a ponty béltraktusának morfológiai tulajdonságaira is, a középbél középső szakaszáról gyűjtött mintákból, a metszetek hematoxin-eozin festését követően. A mérések során azt az eredményt kaptuk, hogy az alkalmazott kezelések hatására a villusok hossza nem változott (karotinoidok, oligoszacharidok), vagy csökkent (antocianinok). A növényi eredetű hatóanyagok a villusok szélességét csökkentették. A bélfal izomrétegének vastagságát nem befolyásolták (karotinoidok, oligoszacharidok) vagy az izomrétegvastagság csökkent (antocianinok), így az alkalmazott hatóanyagok pozitív hatását a ponty táplálóanyag-felszívódásának meghatározásánál nem sikerült kimutatnunk.

## 10. SUMMARY

The application of antibiotics in veterinary medicine is indispensable, however, inappropriate usage has led to increasing concerns due to pathogens resistant to antimicrobial agents. Therefore, many natural alternatives are being investigated these days, to strengthen the defense system of poultry and fish. These potential natural compounds are antioxidants, probiotics or prebiotics, and immunostimulant plant extracts. In our research, we aimed to study the effects of carotenoids, oligosaccharides, and anthocyanins on immunological parameters, intestinal morphology, and microbiota of broiler chicken. Effects of mentioned bioactive plant extracts were examined on fish immunological parameters and intestinal morphology as well.

Ross 308 genotype broiler chickens were placed into experimental groups. The dietary treatments consisted of the control group (basal diet), the  $\beta$ -glucan considered as positive control and supplementation of carotenoids, oligosaccharides, or anthocyanins.  $\beta$ -glucan was added to the basal diet at 0.05%, the other treatments contained 0.5% of each bioactive extract. The experiment lasted for 42 days. The applied bioactive compounds affected neither the live weight of broiler chickens on day 42 nor the average daily gain.  $\beta$ -glucan, oligosaccharides, and anthocyanins increased average daily feed intake through the entire feeding period (1-42 days).

Examination of immunomodulant effects of bioactive compounds was carried out with gene expression analysis. A quantitative PCR was used to evaluate the mRNA levels of *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IFN- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$*  cytokines, and *TLR-4*, *TLR-5* receptors. Among the mentioned cytokines and receptors, gene expression levels of pro-inflammatory *IL-1 $\beta$*  decreased after carotenoid, oligosaccharide, and anthocyanin supplementations. Carotenoids could result in a lower gene expression level of pro-inflammatory *IL-6*. Based on these results, the applied bioactive extracts could inhibit the expression of some pro-inflammatory cytokines and may have a positive impact on inflammatory responses. Since cytokines act as signal proteins between cells during immune responses, the examined bioactive compounds can be potential immunomodulators of cellular immunity.

Possible immunostimulant effects of bioactive compounds were investigated on protein level as well, and concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6, and IgG were investigated by sandwich ELISA assays. Based on the ELISA assay measurements, concentrations of the cytokines showed differences compared to the gene expression levels, which may be

due to various post-transcriptional mechanisms or the different half-lives of proteins.  $\beta$ -glucan and oligosaccharides could reach a higher concentration of plasma IgG, thereby those compounds may improve the chicken humoral immunity.

In our experiments, we investigated the effects of the bioactive compounds on the intestinal morphology of broiler chickens, which can be referred to as nutrient absorption. Morphological measurements were carried out from terminal ileum segments, which were stained with hematoxylin-eosin. Photos were taken from stained segments and villus height, crypt depth, villus height to crypt depth ratio, and total mucosa thickness were determined. Based on the measurements,  $\beta$ -glucan, carotenoids, oligosaccharides, and anthocyanins resulted in higher villus length,  $\beta$ -glucan and anthocyanins could reach higher villus length to crypt depth ratios, and  $\beta$ -glucan, oligosaccharides, and anthocyanins thickened total mucosa. These findings indicate an increased absorption area in the ileum of broiler chicken, therefore the examined natural compounds may have beneficial effects on digestive functions.

In this research, we also examined the effects of natural plant extracts on the intestinal microbiota of broiler chicken. Primer pairs were designed using the 16S rDNA region for each bacterial group and the relative proportion of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Campylobacter*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* were determined with the PCR technique. Based on the band intensity of PCR fragments, carotenoids and anthocyanins could reach a higher relative proportion of *Bifidobacterium*, therefore, these compounds may have a role in maintaining the microbial balance in the gut.

Effects of the applied natural compounds were also investigated on chicken behavior, when carotenoids, oligosaccharides, and anthocyanins affected feed pecking positively, which may suggest the desirable smells/flavors of the mentioned compounds. Feed additives did not alter water drinking. Carotenoids and anthocyanins increased the frequency of wing stretching, which can be referred to as comfort feeling.

The fish experiment was carried out with common carp juveniles. Carp were assigned into 4 experimental groups consisted of the control group (basal diet), and other treatments were supplemented with carotenoids, oligosaccharides, or anthocyanins at 1%. The experiment lasted for 6 weeks and samples were collected on the 6th week. Potential immunostimulant effects of carotenoids, oligosaccharides, and anthocyanins were investigated by gene expression analysis on mRNA levels of *IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *TNF- $\alpha$* , and *IRF-1* in the spleen and the middle part of the intestinal tract. Neither carotenoids,

oligosaccharides, nor anthocyanins affected mRNA expression levels of the mentioned cytokines compared to control birds, however, carotenoids resulted in lower gene expression level of intestinal *IL-1 $\beta$*  contrasted to anthocyanin-fed birds. Based on the results, we concluded the applied bioactive agents did not affect the mRNA level of examined cytokines neither in the spleen nor in the intestine.

Effects of carotenoids, oligosaccharides, and anthocyanins were also investigated on fish intestinal morphology, and segments were collected from the middle part of the mid-intestine and stained with hematoxylin-eosin. No alterations were found in the length of villi after carotenoid and oligosaccharide supplementations, and villus length was smaller in anthocyanin treatment. The applied carotenoids, oligosaccharides, and anthocyanins decreased the width of villi. Carotenoids and oligosaccharides did not influence the thickness of the intestinal muscular layer, while anthocyanins decreased the mentioned parameter. In the fish experiment, the applied bioactive compounds did not impact nutrient absorption positively.

## 11. IRODALOMJEGYZÉK

1. ACTON, R.T. – WEINHEIMER, P.F. – HALL, S.J. – NIEDERMEIER, W. – SHELTON, E. – BENNETT, J.C. (1971): Tetrameric immune macroglobulins in three orders of bony fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 68, 107–111.
2. AIDA, F.M.N.A. – SHUHAIMI, M. – YAZID, M. – MAARUF, A.G. (2009): Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 20, 567-575.
3. AHAD, S. – TANVEER, S. – NAWCHOO, I.A. – MALIK, T.A. (2017): Anticoccidial activity of *Artemisia vestita* (Anthemideae, Asteraceae) – a traditional herb growing in the Western Himalayas, Kashmir, India. *Elsevier, Microbial Pathogenesis*. 104, 289-295.
4. AKBARI, M.R. – HAGHIGHI, H.R. – CHAMBERS, J.R. – BRISBIN, J. – READ, L.R. – SHARIF, S. (2008): Expression of Antimicrobial Peptides in Cecal Tonsils of Chickens Treated with Probiotics and Infected with *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *Clinical Vaccine Immunology*. 15, 1689-1693.
5. AKHAVAN-SALAMAT, H. – GHASEMI, H.A. (2019): Effect of different sources and contents of zinc on growth performance, carcass characteristics, humoral immunity and antioxidant status of broiler chickens exposed to high environmental temperatures. *Livestock Science*. 223, 76-83.
6. AKIRA, S. – TAKEDA, K. – KAISHO, T. (2001): Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*. 2, 675–680.
7. AL-DOHAIL, M.A – HASHIM, R. – ALIYU-PAIKO, M. (2009): Effects of the probiotic, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth performance, haematology parameters and immunoglobulin concentration in African Catfish (*Clarias gariepinus*, Burchell 1822) fingerling. *Aquaculture Research*. 40, 1642-1652.
8. NYITRAI, L. (szerk.) (2013): Géntechnológia és fehérjemérnökség. ELTE Biokémiai Tanszék. Elektronikus jegyzet, Budapest.
9. ALEXANDER, J.B. – INGRAM, G.A. (1992): Noncellular nonspecific defense mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease*. 2, 249–279.
10. AMAR, E.C. – KIRON, V. – OKAMOTO, N. – SATOH, S. – WATANABE, T. (2000): Effects of  $\beta$ -carotene on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fisheries Science*. 66, 1068-1075.

11. AMAR, E.C. – KIRON, V. – SATOH, S. – WATANABE, T. (2001): Influence of various dietary synthetic carotenoids on bio-defense mechanisms in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture Research*. 32, 162-173.
12. AMAR, E.C. – KIRON, V. – SATOH, S. – WATANABE, T. (2004): Enhancement of innate immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) associated with dietary intake of carotenoids from natural products. *Fish & Shellfish Immunology*. 16, 527-537.
13. AMIT-ROMACH, E. – SKLAN, D. – UNI, Z. (2004): Microflora Ecology of the Chicken Intestine Using 16S Ribosomal DNA Primers. *Poultry Science*. 83, 1093-1098.
14. ANDREWS, D.M. – ANDONIOU, C.E. – SCALZO, A.A. – VAN DOMMELEN, S.L.H. – WALLACE, M.E. – SMYTH, M.J. – DEGLI-ESPOSTI, M.A. (2005): Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection. *Molecular Immunology*. 42, 547555.
15. ANTUS, S. – MÁTYUS, P. (2014): Szerves kémia III. Nemzedékek Tudása Tankönyvkiadó, Budapest, 99p.
16. ARANISHI, F. – NAKANE, M. (1997): Epidermal proteases of the Japanese eel. *Fish Physiology and Biochemistry*. 16, 471–478.
17. ATTIA, Y.A. – HASSAN, R.A. – QOTA, M.A. (2009): Recovery from adverse effects of heat stress on slow-growing chicks in the tropics 1. Effect of ascorbic acid and different levels of betaine. *Tropical Animal Health and Production*. 41, 807–818.
18. BABU, U.S. – SOMMERS, K. – HARRISON, L.M. – BALAN, K.V. (2012): Effects of fructooligosaccharide-inulin on *Salmonella*-killing and inflammatory gene expression in chicken macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 149, 92– 96.
19. BAILEY, J. – BLANKENSHIP, L. – COX, N. (1991): Effect of fructooligosaccharide on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. *Poultry Science*. 70, 2433–2438.
20. BAKHSHALINEJAD, R. – AKBARI MOGHADDAM KAKHKI, R. – ZOIDIS, E. (2018): Effects of different dietary sources and levels of selenium supplements on growth performance, antioxidant status and immune parameters in Ross 308 broiler chickens. *British Poultry Science*. DOI: 10.1080/00071668.2017.1380296.

21. BARNES, E.M. – MEAD, G.C. – BARNUM, D.A. – HARRY, E.G. (1972): The intestinal flora of the chicken in the period 2 to 6 weeks of age, with particular reference to the anaerobic bacteria. *British Poultry Science*. 13, 311-326.
22. BARNES, B. – LUBYOVA, B. – PITHA, P.M. (2002): On the role of IRF in host defense. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 22, 59– 71.
23. BARTHOLOMEW, M.J. – HOLLINGER, K. – VOSE D. (2003): Characterizing the risk of antimicrobial use in food animals: Fluoroquinolone-resistant *Campylobacter* from consumption of chicken. In *Microbial Food Safety in Animal Agriculture: Current Topics*. Szerk. TORRENCE M. E., ISAACSON R. E., Iowa State Press: Ames, IA, USA, 293–301.
24. BAYNE, C.J. – GERWICK, L. (2001): The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 25, 725–743.
25. BÉRI, B. (2011): *Tartástechnológia*. Debreceni Egyetem, Nyugat-Magyarországi Egyetem, Pannon Egyetem. 49p.
26. BIENENSTOCK, J. – PEREY, D.Y.E. – GAULDIE, J. – UNDERDOWN, B.J. (1972). Chicken immunoglobulin resembling  $\gamma$  A. *Journal of Immunology*. 109, 403-406.
27. BIRKEMO, G.A. – LUDERS, T. – ANDERSEN, O. – NES, I.F. – NISSENMEYER, J. (2003): Hipposin, a histone-derived antimicrobial peptide in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*. 1646, 207–215.
28. BOSHRA, H. – LI, J. – SUNYER, J.O. (2006): Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 20, 239–262.
29. BOUDJELLAB, N. – CHAN-TANG, H.S. – ZHAO, X. (2000): Bovine interleukin-1 expression by cultured mammary epithelial cells (MAC-T) and its involvement in the release of MACT derived interleukin-8. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 127, 191–199.
30. BOWDEN, T.J. – BUTLER, R. – BRICKNELL, I.R. – ELLIS, A.E. (1997): Serum trypsininhibitory activity in five species of farmed fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 7, 377–385.
31. BOWDEN, T.J. – COOK, P. – ROMBOUT J.H.W.M. (2005): Development and function of the thymus in teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*. 19, 413–427.

32. BRANDT, L. – KOSCHE, K. – GREENWALD, D. – BERKMAN, D. (1999): Clostridium Difficile-Associated Diarrhea in The Elderly. The American Journal of Gastroenterology. 94. 3263-3266.
33. CAI, S.J. – WU, C.X. – GONG, L.M. – SONG, T. – WU, H. – ZHANG, L.Y. (2012): Effects of nanoselenium on performance, meat quality, immune function, oxidation resistance, and tissue selenium content in broilers. Poultry Science. 91, 2532-2539.
34. CAIN, K.D. – JONES, D.R. – RAISON, R.L. (2000): Characterisation of mucosal and systemic immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using surface plasmon resonance. Fish and Shellfish Immunology. 10, 651– 666.
35. CANDRIAN, U. – FURRER, B. – HOFELEIN, C. – MEYER, R. – JERMINI, M. – LUTHY, J. (1991): Detection of *Escherichia coli* and identification of enterotoxigenic strains by primer-directed enzymatic amplification of specific DNA sequences. International Journal of Food Microbiology. 12, 339–351.
36. CARVALHO, F.B. – GUTIERRES, J.M. – BOHNERT, C. – ZAGO, A.M. – ABDALLA, F.H. – VIEIRA, J.M. – PALMA, H.E. – OLIVEIRA, S.M. – SPANELLO, R.M. - DUARTE, M.M. (2015): Anthocyanins suppress the secretion of proinflammatory mediators and oxidative stress, and restore ion pump activities in demyelination. Journal of Nutrition and Biochemistry. 26, 378–390.
37. CATONI, C. – MARTIN SHAEFER, H. – PETERS, A. (2008): Fruit for health: the effect of flavonoids on humoral immune response and food selection in a frugivorous bird. Functional Ecology. 22, 649–654.
38. CHANG, Q. – WANG, W. – REGEV-YOCHAY, G. – LIPSITCH M. – HANAGE W. P. (2015): Antibiotics in agriculture and the risk to human health: How worried should we be? Evolutionary Applications. 8, 240–245.
39. CHANGXING, L. – CHENLING, M. – ALAGAWANY, M. – JIANHUA, L. – DONGFANG, D. –GAICHAO, W. – WENYIN, Z. – SYED, S.F. – ARAIN, M.A. – SAEED, M. (2018): Health benefits and potential applications of anthocyanins in poultry feed industry. World’s Poultry Science Journal. 74, 251–264.
40. CHEN, L. – HE, C. – BAOPRASERTKUL, P. – XU, P. – LI, P. – SERAPION, J. – WALDBIESER, G. – WOLTERS, W. – LIU, Z. (2005): Analysis of a catfish gene resembling interleukin-8: cDNA cloning, gene structure, and expression after infection with *Edwardsiella ictaluri*. Elsevier, Developmental and Comparative Immunology. 29, 135-142.

41. CHEN, K.L. – WENG, B.C. – CHANG, B.T. – LIAO, Y.H. – CHEN, T.T. (2008): Direct enhancement of the phagocytic and bactericidal capability of abdominal macrophage of chicks by beta-1,3-1,6-glucan. *Poultry Science*. 87, 2242-2249.
42. CHEN, H – LIU, S. – XU, X.R. – ZHOU, G.J. – LIU, S.S. – YUE, W.Z. – SUN, K.F. – YING, G.G. (2015): Antibiotics in the coastal environment of the Hailing Bay region, South China Sea: spatial distribution, source analysis and ecological risks. *Marine Pollution Bulletin*. 95, 365–373.
43. CHO, J.H. – ZHANG, Z.F. – KIM, I.H. (2013): Effects of single or combined dietary supplementation of  $\beta$ -glucan and kefir on growth performance, blood characteristics and meat quality in broilers. *British Poultry Science*. 54, 216-221.
44. CLAVIJO, V. – FLÓREZ, M.J.V. (2018): The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science*. 97, 1006–1021.
45. COLLIER, C.T. – CARROL, J.A. – BALLOU, M.A – STARKEY, J.D. – SPARKS, J.C. (2011): Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae boulardii* reduces mortality associated with immune and cortisol responses to *Escherichia coli* endotoxin in pigs. *Journal of Animal Science*. 89, 52–58.
46. COOK, M.T. – HAYBALL, P.J. – BIRDSEYE, L. – BAGLEY, C. – NOWAK, B.F. – HAYBALL, J.D. (2003): Isolation and partial characterization of a pentraxin-like protein with complementfixing activity from snapper (*Pagrus auratus*, Sparidae) serum. *Developmental and Comparative Immunology*. 27, 579–588.
47. CORTHAY, A. (2006): A three-cell model for activation of naïve T helper cells. *Scandinavian Journal of Immunology*. 64, 93–96.
48. CORWIN, E.J. (2000): Understanding cytokines part I: Physiology and mechanisms of action. *Biological Research Nursing*. 2, 30.
49. COX, C.M. – SUMNERS, L.H. – KIM, S. – MCELROY, A.P. – BEDFORD, M.R. – DALLOUL, R.A. (2010a): Immune responses to dietary  $\beta$ -glucan in broiler chicks during an *Eimeria* challenge. *Poultry Science*. 89, 2597–2607.
50. COX, C.M. – STUARD, L.H. – KIM, S. – MCELROY, A.P. – BEDFORD, M.R. – DALLOUL, R.A. (2010b): Performance and immune responses to dietary  $\beta$ -glucan in broiler chicks. *Poultry Science*. 89, 1924–1933.

51. CROSS, D.E. – MCDEVITT, R.M. – HILLMAN, K. – ACAMOVIC, T. (2007): The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science*. 48, 496–506.
52. CSAPÓ, J. – CSAPÓNÉ, K.ZS. (2003): *Élelmiszer-kémia*. Mezőgazda kiadó, Budapest, ISBN 978-963-286-642-0, 211p.
53. DANNEVING, B.H. – LAUVE, A. – MCPRESS, L.C. – LANDSVERK, T. (1994): Receptor-mediated endocytosis and phagocytosis by rainbow trout head kidney sinusoidal cells. *Fish and Shellfish Immunology*. 4, 3–18.
54. DAS, S. – MONDAL, K. – HAQUE, S. (2017): A review on application of probiotic, prebiotic and synbiotic for sustainable development of aquaculture. *Journal of Entomology and Zoology Studies*. 5, 422–429.
55. DAS, Q. – TANG, J. – YIN, X. – ROSS, K. – WARRINER, K. – MARCONE, M.F. – DIARRA M, S. (2020a): Organic cranberry pomace and its ethanolic extractives as feed supplement in broiler: impacts on serum immunoglobulin titers, liver and bursal immunity. *Poultry Science*.
56. DAS, Q. – ISLAM, M.R. – LEPP, D. – TANG, J. – YIN, X. – MATS, L. – LIU, H. – ROSS, K. – KENNES, Y.M. – YACINI, H. – WARRINER, K. – MARCONE, M.F. – DIARRA, M.S. (2020b): Gut Microbiota, Blood Metabolites, and Spleen Immunity in Broiler Chickens Fed Berry Pomaces and Phenolic-Enriched Extractives. *Frontiers in Veterinary Science*. 7, 150.
57. DAVIS, J.M. – CLAY, H. – LEWIS, J.L. – GHORI, N. – HERBOMEL, P. – RAMAKRISHNAN, L. (2002): Real-time visualization of mycobacterium-macrophage interactions leading initiation of granuloma formation in zebrafish embryos. *Immunity*. 17, 693–702.
58. DAVISON, F. (2008): The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features. In: *Avian Immunology*. Szerk. DAVISON F., KASPERS B., SCHAT K.A., Elsevier, London, UK, 1-11.
59. DAVISON, F. – MAGOR, K.E. – KASPERS, B. (2008): Structure and Evolution of Avian Immunoglobulins. In: *Avian Immunology*. Szerk. DAVISON F., KASPERS B., SCHAT K.A., Elsevier, London, UK, 107-127.
60. DEÁK, T. – KISKÓ, G. – MARÁZ, A. – MOHÁCSINÉ FARKAS, CS. (2006): *Élelmiszer-mikrobiológia*. Mezőgazda Kiadó. Budapest, pp. 45-72.

61. DEFOIRDT, T. – SORGELOOS, P. – BOSSIER, P. (2011): Alternatives to antibiotics for control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion in Microbiology*. 14, 251-258., 10.1016/j.mib.2011.03.004.
62. DE HAAS, C.J. – VAN LEEUWEN, E.M.M. – VAN BOMMEL, T. – VERHOEF, J. – VAN KESSEL, K.P.M. – VAN STRIJP, J.A.G. (2000): Serum amyloid P component bound to Gram-negative bacteria prevents lipopolysaccharide-mediated classical pathway complement activation. *Infection and Immunity*. 68, 1753–1759.
63. DE, U.K. – MUKHERJEE, R. (2009): Expression of cytokines and respiratory burst activity of milk cells in response to *Azadirachta indica* during bovine mastitis. *Tropical Animal Health and Production*. 41, 189–197.
64. DENEV, S.A. (2008): Ecological alternatives of antibiotic growth promoters in animal husbandry and aquaculture. DSc. Thesis. Starajagora, Bulgaria. Department of Biochemistry Microbiology, Trakia University, 294.
65. DENIS, M. – REFRÉGIER-PETTON, J. – LAISNEY, M. – ERMEL, G. – SALVAT, G. (2001): *Campylobacter* contamination in French chicken production from farm to consumers. Use of a PCR assay for detection and identification of *Campylobacter jejuni* and *Camp. coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 91, 255-267.
66. DHABHAR, F.S. (2009): Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: Implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation*. 16, 300-317.
67. DIAZ CARRASCO, J.M. – CASANOVA, N.A. – FERNÁNDEZ MIYAKAWA, M.E. (2019): Microbiota, Gut Health and Chicken Productivity: What Is the Connection? *Microorganisms*. 7, 374.
68. DIEHL, S. – ANGUITA, J. – HOFFMEYER, A. – ZAPTON, T. – IHLE, J.N. – FIKRIG, E. -RINCON, M. (2000): Inhibition of Th1 differentiation by IL-6 is mediated by SOCS1. *Immunity*. 13, 805–881.
69. DINARELLO, C.A. (2000): Proinflammatory cytokines. *Chest*. 118, 503–508.
70. DOS SANTOS, N.M. – ROMANO, N. – DE SOUSA, M. – ELLIS, A.E. – ROMBOUT, J.H. (2000): Ontogeny of B and T cells in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 10, 583–596.
71. DOZOIS, C.M. – DAIGLE, F. – CURTISS, R. (2003): Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic

- Escherichia coli strain. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA. 100, 247-252.
72. DUBLECZ, K. (2011): Baromfitakarmányozás: Oktatási segédlet az Állattenyésztő mérnöki és a Takarmányozási és takarmánybiztonsági mérnöki MSc szakos hallgatók részére. Pannon Egyetem, 7p.
73. EBRAHIMZADEH, S.K. – NAVIDSHAD, B. – FARHOOMAND, P. – AGHJEHGHEHLAGH, F.M. (2018): Effects of grape pomace and vitamin E on performance, antioxidant status, immune response, gut morphology and histopathological responses in broiler chickens. South African Journal of Animal Science. 48, 324-336.
74. EL IRAQI, K. G. – FAYED, R. H. (2012): Effect of Yeast as Feed Supplement on Behavioural and Productive Performance of Broiler Chickens. Life Science Journal. 9, 4026-4031.
75. EL-KELAWY, M. I. – ELNAGGAR, A.S.H. – ABDELKHALEK, E. (2018): Productive performance, blood parameters and immune response of broiler chickens supplemented with grape seed and *Medicago sativa* as natural sources of polyphenols. Egyptian Poultry Science Journal. 38, 269-288.
76. ELLIS, A.E. (2001): Innate host defence mechanism of fish against viruses and bacteria. Developmental and Comparative Immunology. 25, 827-839.
77. EL-SENOUSEY, H.K. – CHEN, B. – WANG, J.Y. – ATTA, A.M. – MOHAMED, F.R. – NIE, Q.H. (2018): Effects of dietary vitamin C, vitamin E, and alpha-lipoic acid supplementation on the antioxidant defense system and immune-related gene expression in broilers exposed to oxidative stress by dexamethasone. Poultry Science. 97, 30-38.
78. ERDEI, A. – SÁRMAI, G. – PRECHL, J. (2012): Immunológia. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest. 25-26, 130-132.
79. EVANS, D. – JASO-FRIEDMANN, L. (1992): Nonspecific cytotoxic cells as effectors of immunity in fish. Annual Review of Fish Disease. 2, 109.
80. EVOLI, A. – MEACCI, E. (2019): An update on thymectomy in myasthenia gravis. Expert Review of Neurotherapeutics. 5, 1-11.
81. FABER, T.A. – DILGER, R.N. – HOPKINS, A.C. – PRICE, N.P. – FAHEJ, G.C. Jr. (2012): The effects of a galactoglucomannan oligosaccharide-arabinoxylan (GGMO-AX) complex in broiler chicks challenged with *Eimeria acervulina*. Poultry Science. 91, 1089–1096.

82. FARAHAT, M. – ABDALLAH, F. – ABDEL-HAMID, T. – HERNANDEZ-SANTANA, A. (2016): Effect of supplementing broiler chicken diets with green tea extract on the growth performance, lipid profile, antioxidant status and immune response. *British Poultry Science*. DOI: 10.1080/00071668.2016.1196339.
83. FERGUSON, H.W. (1989): *Systemic Pathology of Fish. A text and atlas comparative tissue response in diseases of teleost*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. 5–103.
84. FISCHER, A.H. – JACOBSON, K.A. – ROSE, J. – ZELLER, R. (2008): Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protocols*.
85. FISCHER, U. – UTKE, K. – SOMAMOTO, T. – KOLLNER, B. – OTOTAKE, M. – NAKANISHI, T. (2006): Cytotoxic activities of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 20, 209–226.
86. FUJIMOTO, I. – PAN, J. – TAKIZAWA, T. – NAKANISHI, Y. (2000): Virus clearance through apoptosis-dependent phagocytosis of influenza A virus-infected cells by macrophages. *Journal of Virology*. 74, 3399–3403.
87. GAO, Y.Y. – XIE, Q.M. – JIN, L. – SUN, B.L. – JI, J. – CHEN, F. – MA, J.Y. – BI, Y.Z. (2012): Supplementation of xanthophylls decreased proinflammatory and increased anti-inflammatory cytokines in hens and chicks. *British Journal of Nutrition*. 108, 1746–1755.
88. GIBSON, M.S. – KAISER, P. – FIFE, M. (2014): The chicken IL-1 family: evolution in the context of the studied vertebrate lineage. *Immunogenetics*. 66, 427–438.
89. GIBSON, G.R. – ROBERFROID, M.B. (1995): Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotica. *Journal of Clinical Nutrition*. 125, 1401-1412.
90. GILLINGS, M.R. (2013): Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome, and microbial pangenome. *Frontiers in Microbiology*. 4.
91. GLICK, B. – CHANG, T.S. – JAAP, R.G. (1956): The bursa of Fabricius and antibody production. *Poultry Science*. 35, 224–225.
92. GÖBEL, T.W.; SCHNEIDER, K.; SCHAERER, B.; MEJRI, I.; PUEHLEER, F.; WEIGEND, S.; STAEHELI, P.; KASPERS, B. (2003): IL-18 stimulates the proliferation and IFN-gamma release of CD4 + T cells in the chicken:

- Conservation of a Th1-like system in a non mammalian species. *Journal of Immunology*. 171, 1809–1815.
93. GOMES, A.M.P. – MALCATA, F.X. (1999): *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. *Trends in Food Science & Technology*. 10, 139–157.
  94. GOMEZ, D.G. – BALCAZAR, J.L. (2008): A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 52, 145–154.
  95. GONG, H.Z. – WU, M. – LANG, W.Y. – YANG, M. – WANG, J.H. – WANG, Y.Q. – ZHANG, Y. – ZHENG, X. (2020): Effects of laying breeder hens dietary  $\beta$ -carotene, curcumin, allicin, and sodium butyrate supplementation on the growth performance, immunity, and jejunum morphology of their offspring chicks. *Poultry Science*. 99, 151-162.
  96. GONZALEZ, S.F. – HUISING, M.O. – STAKAUSKAS, R. – FORLENZA, M. – VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L. – BUCHMANN, K. – NIELSEN, M.E. – WIEGERTJES, G.F. (2007): Real-time gene expression analysis in carp (*Cyprinus carpio* L.) skin: Inflammatory responses to injury mimicking infection with ectoparasites. *Elsevier, Developmental & Comparative Immunology*. 31, 244–254.
  97. GOODWIN, T.W. (1986): Metabolism, nutrition, and function of carotenoids. *Annual Review of Nutrition*. 6, 273–297.
  98. GREENBAUM, D. – COLANGELO, C. – WILLIAMS, C. – GERSTEIN, M. (2003): Comparing protein abundance and mRNA expression levels on a genomic scale. *Genome Biology*. 4, 117.
  99. GUO, F.C. – KWAKKEL, R.P. – WILLIAMS, B.A. – PARMENTIER, H.K. – LI, W.K. – YANG, Z.Q. – VERSTEGEN, M.W.A. (2004): Effects of mushroom and herb polysaccharides on cellular and humoral immune responses of *Eimeria tenella*-infected chickens. *Poultry Science*. 83, 1124-1132.
  100. HASEGAWA, S. – NAKAYASU, C. – YOSHITOMI, T. – NAKANISHI, T. – OKAMOTO, N. (1998): Specific cell-mediated cytotoxicity against an allogeneic target cell line in isogeneic ginbuna crucian carp. *Fish and Shellfish Immunology*. 8, 303–313.

101. HATTEN, F. – FREDRIKSEN, A. – HORDVIK, I. – ENDRESEN, C. (2001): Presence of IgM in cutaneous mucus, but not in gut mucus of Atlantic salmon, *Salmo salar*. Serum IgM is rapidly degraded when added to gut mucus. *Fish and Shellfish Immunology*. 11, 257–268.
102. HAYASHI, F. – SMITH, K.D. – OZINSKY, A. – HAWN, T.R. – YI, E.C. – Goodlett, D.R. (2001): The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor-5. *Nature*. 410, 1099.
103. HEIDARIEH, M. – MIRVAGHEFI, A.R. – SEPAHI, A. – SHEIKHZADEH, N. – SHAHBAZFAR, A.A. – AKBARI, M. (2013): Effects of dietary Aloe vera on growth performance, skin and gastrointestinal morphology in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Fisheries and Aquatic Science*. 13, 367–373.
104. HIBIYA, T. (1994): An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Germany. 5–125.
105. HOELZER, K. – WONG, N. – THOMAS, J. (2017): Antimicrobial drug use in food-producing animals and associated human health risks: What, and how strong, is the evidence? *BMC Veterinary Research*. 13, 211.
106. HOLLAND, M.C. – LAMBRIS, J.D. (2002): The complement system of teleosts. *Fish and Shellfish Immunology*. 12, 399–420.
107. HOMOKI, J.R. – NEMES, A. – FAZEKAS, E. – GYÉMÁNT, G. – BALOGH, P. – GÁL, F. – AL-ASRI, J. – MORTIER, J. – WOLBER, G. – BABINSZKY, L. (2016): Anthocyanin composition, antioxidant efficiency, and  $\alpha$ -amylase inhibitor activity of different Hungarian sour cherry varieties (*Prunus cerasus* L.). *Food Chemistry*. 194, 222–229.
108. HONG, Y.H. – LILLEHOJ, H.S. – LILLEHOJ, E.P. – LEE, S.H. (2006): Changes in immune-related gene expression and intestinal lymphocyte subpopulations following *Eimeria maxima* infection in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 114, 259–272.
109. HOSEINIFAR, S.H. – ESTEBAN, M.A. – ALBERTO, C. – SUN, Y-Z. (2015): Prebiotics and Fish Immune Response: A Review of Current Knowledge and Future Perspectives. *Reviews in Fisheries Science & Aquaculture*. 23, 315-328.
110. HOSEINIFAR, S.H. – RINGO, E. – SHENAVAR MASOULEH, A. – ESTEBAN M.Á. (2016): Probiotic, prebiotic and synbiotic supplements in sturgeon aquaculture: A review. *Reviews in Aquaculture*. 8, 89-102.

111. HOSEINIFAR, S.H. – SUN, Y.Z. – CAIPANG, C.M. (2017): Short chain fatty acids as feed supplements for sustainable aquaculture: An updated view. *Aquaculture Research*. 48, 1380-1391.
112. HUISING, M.O. – STOLTE, E. – FLIK, G. – SAVELKOUL, H.F.J. – VERBURG-VAN KEMENADE, B.M.L. (2003): CXC chemokines and leukocyte chemotaxis in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*. 27, 875–888.
113. HUTCHINSON, T.W.S. – RIDDEL, C. (1990): A study of hepatic lesions in broiler chickens at processing plants in Saskatchewan. *The Canadian Veterinary Journal*. 31, 20–25.
114. HUYGHEBAERT, G. – DUCATELLE, R. – VAN IMMERSEEL, F. (2011): An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *Veterinary Journal*. 187, 182–188.
115. IJI, P.A. – SAKI, A.A. – TIVEY, D.R. (2001): Intestinal structure and function of broiler chickens on diets supplemented with a mannan oligosaccharide. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 81, 1186–1192.
116. INGRAM, G.A. (1980): Substances involved in the natural resistance of fish to infection a review. *Journal of Fish Biology*. 16, 23–60.
117. IQBAL, M. – PHILBIN, V.J. – WITHANAGE, G.S. – WIGLEY, P. – BEAL, R.K. – GOODCHILD, M.J. (2005): Identification and functional characterisation of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infection and Immunity*. 73, 2344-2350.
118. IRIANTO, A. – AUSTIN, B. (2002): Use of probiotics to control furunculosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*. 25, 333-342.
119. JANG, I.S. – KO, Y.H. – MOON, Y.S. – SOHN, S.H. (2014): Effects of vitamin C or E on the pro-inflammatory cytokines, heat shock protein 70 and antioxidant status in broiler chicks under summer conditions. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 27, 749.
120. JENKINS, K.J. – COLLINS, F.W. – HIDIROGLOU, M. (1992): Research Note: Efficacy of Various Flavonoids and Simple Phenolics in Prevention of Nutritional Myopathy in the Chick. *Poultry Science*. 71, 1577-1580.

121. JENKINS, P.G. – WRATHMELL, A.B – HARRIS, J.E. – PULSFORD, A.L. (1994): Systemic and mucosal immune response to enterically delivered antigen in *Oreochromis mossambicus*. *Fish and Shellfish Immunology*. 4, 255–271.
122. JEURISSEN, S.H.M. (1991): Structure and function of the chicken spleen. 38th Forum in Immunology. Central Veterinary Institute, Department of Virology, RA Lelystad, The Netherlands. 352-355.
123. JIANG, H. – YANG, H. – KAPCZYNSKI, D.R. (2011): Chicken interferon alpha pretreatment reduces virus replication of pandemic H1N1 and H5N9 avian influenza viruses in lung cell cultures from different avian species. *Virology Journal*. 8, 447.
124. JOSEPH, S.V. – EDIRISINGHE, I. – BURTON-FREEMAN, B.M. (2016): Fruit Polyphenols: A Review of Anti-inflammatory Effects in Humans. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56, 419-444.
125. JUHÁSZ, G. – KOVÁCS, A. – LÁSZLÓ, L. – LŐW, P. (2013): Az önemésztés, sejtpusztulás és megújulás molekuláris sejtbiológiája. Eötvös Loránd Tudományegyetem. Budapest, 5p.
126. KHAN, S. – ROBERTS, J. – WU, S.-B. (2020): Regulation of Immunity-Related Genes by Infectious Bronchitis Virus Challenge in Spleen of Laying Chickens. *Viral Immunology*. 33, DOI: 10.1089/vim.2019.0139.
127. KAISER, P. (2010): Advances in avian immunology – prospects for disease control: a review. *Avian Pathology*. 39, 309-324.
128. KAISER, P. – STÄHELI, P. (2008): Avian cytokines and chemokines. In: *Avian Immunology*. Szerk. Davison F., Kaspers B., Schat, K.A., Elsevier, London, UK, 203-222.
129. KAMBAYASHI, T. – JACOB, C.O. – ZHOU, D. – MAZUREK, N. – FONG, M. – STRASSMANN, G. (1995): Cyclic nucleotide phosphodiesterase type IV participates in the regulation of IL-10 and in the subsequent inhibition of TNF- $\alpha$  and IL-6 release by endotoxin-stimulated macrophages. *Journal of Immunology*. 155, 4909–4916.
130. KAMBOH, A.A. – HANG, S.-Q. – KHAN, M.A. – ZHU, W.-Y. (2016): In vivo immunomodulatory effects of plant flavonoids in lipopolysaccharid-challenged broilers. *Animal*. 10, 1619–1625.
131. KANAZAWA, N. – KUROSAKI, M. – SAKAMOTO, N. – ENOMOTO, N. – ITSUI, Y.– YAMASHIRO, T. – TANABE, Y. – MAEKAWA, S. –

- NAKAGAWA, M. – CHEN, C.H. (2004): Regulation of Hepatitis C virus replication by interferon regulatory factor 1. *Journal of Virology*. 78, 9713–9720.
132. KEESTRA, A.M. – DE ZOETE, M.R. – VAN AUBEL, R.A.M.H. – VAN PUTTEN, J.P.M. (2007): Functional characterization of chicken TLR5 reveals species-specific recognition of flagellin. *Molecular Immunology*. 45, 1298–1307.
133. KLASING, K.C. (1988): Nutritional aspects of leukocytic cytokines. *Journal of Nutrition*. 118, 1436–1446.
134. KLASING, K.C. (2007): Nutrition and the immune system. *British Poultry Science*. 48, 525–537.
135. KOGUT, M.H. – IQBAL, M. – HE, H. – PHILBIN, V. – KAISER, P. – SMITH, A. (2005): Expression and function of Toll-like receptors in chicken heterophils. *Developmental & Comparative Immunology*. 29, 791–807.
136. KOGUT, M.H. (2013): The gut microbiota and host innate immunity: Regulators of host metabolism and metabolic diseases in poultry?<sup>1</sup>. *Journal of Applied Poultry Research*. 22, 637-646.
137. KOUTSOS, E.A. – CLIFFORD, A.J. – CALVERT, C.C. – KLASING, K.C. (2003): Maternal Carotenoid Status Modifies the Incorporation of Dietary Carotenoids into Immune Tissues of Growing Chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of Nutrition*. 133, 1132-1138.
138. KOUTSOS, E.A. – LOPEZ, J.C.G. – KLASING, K.C. (2006): Carotenoids from in ovo or dietary sources blunt systemic indices of the inflammatory response in growing chicks (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of Nutrition*. 136, 1027–1031.
139. KOVÁCS, P. (2011): Immunomodulátorok. In: *A farmakológia alapjai*. Szerk. GYIRES K., FÜRST ZS., Budapest, Medicina Könyvkiadó Zrt. 1048p.
140. KUMAR, S. – CHEN, C. – INDUGU, N. – WERLANG, G.O. – SINGH, M. – KIM, W.K. – THIPPAREDDI, H. (2018): Effect of antibiotic withdrawal in feed on chicken gut microbial dynamics, immunity, growth performance and prevalence of foodborne pathogens. *PLoS ONE*. 13, e0192450.
141. KUMAR, S. – CIRACI, C. – REDMOND, S.B. – CHUAMMITRI, P. – ANDREASEN, C.B. – PALIC, D. – LAMONT, S.J. (2011): Immune response gene expression in spleens of diverse chicken lines fed dietary immunomodulators. *Poultry Science*. 90, 1009–1013.
142. LANGENDIJK, P.S. – SCHUT, F. – JANSEN, G.J. – RAANGS, G.C. – KAMPHUIS, G.R. – WILKINSON M.H. – WELLING, G.W. (1995):

- Quantitative fluorescence in situ hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 61, 3069–3075.
143. LEBACQ-VERHEYDEN, A.M. – VAERMAN, J.-P. – HEREMANS, J.F. (1974): Quantification and distribution of chicken immunoglobulins IgA, IgM and IgG in serum and secretions. *Immunology*. 27, 683-692.
144. LEE, S.J. – BAI, S.K. – LEE, K.S. – NAMKOONG, S.- NA, H.J. – HA, K.S. – HAN, J.A. – YIM, S.V. – CHANG, K. – KWON, Y.G. (2003): Astaxanthin Inhibits Nitric Oxide Production and Inflammatory Gene Expression by Suppressing I $\kappa$ B Kinase-dependent NF- $\kappa$ B Activation. *Molecules and Cells*. 16, 97–105.
145. LEE, K.W. – LEE, S.H. – LILLEHOJ, H.S. – LI, G.X. – JANG S.I. – BABU, U.S. – PARK, M.S. – KIM, D.K. – LILLEHOJ, E.P. – NEUMANN, A.P. – REHBERGER, T.G. – SIRAGUSA, G.R. (2010): Effects of direct-fed microbials on growth performance, gut morphometry, and immune characteristics in broiler chickens. *Poultry Science*. 89, 203-216.
146. LEV, M. – BRIGGS, C.A.E. (1956): The gut flora of the chicks. 1. The flora of newly hatched chicks. *Journal of Applied Bacteriology*. 19, 36-38.
147. LEVEQUE, G. – FORGETTA, V. – MORROLL, S. – SMITH, A.L. – BUMSTEAD, N. – BARROW, P. (2003): Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* infection in chickens. *Infection and Immunity*. 71, 1116-1124.
148. LI, J. – HOU, Y. – YI, D. – ZHANG, J. – WANG, L. – QIU, H. – DING, B. – GONG, J. (2015a): Effects of Tributyrin on Intestinal Energy Status, Antioxidative Capacity and Immune Response to Lipopolysaccharide Challenge in Broilers. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 28, 1784-1793.
149. LI, L. – FENG, L. – JIANG, W.D. – JIANG, J. – WU, P. – KUANG, S.Y. (2015b): Dietary pantothenic acid deficiency and excess depress the growth, intestinal mucosal immune and physical functions by regulating NF- $\kappa$ B, TOR, Nrf2 and MLCK signaling pathways in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish and Shellfish Immunology*. 45, 399-413.
150. LI, L. – WANG, L. – WU, Z. – YAO, L. – WU, Y. – HUANG, L. – LIU, K. – ZHOU, X. – GOU, D. (2014): Anthocyanin-rich fractions from red raspberries

- attenuate inflammation in both RAW264.7 macrophages and a mouse model of colitis. *Scientific Reports*. 4, 6234.
151. LI, M.Y. – SUN, L. – NIU, X.T. – CHEN, X.M. – TIAN, J.X. – KONG, Y.D. – WANG, G.Q. (2019): Astaxanthin protects lipopolysaccharide induced inflammatory response in *Channa argus* through inhibiting NF- $\kappa$ B and MAPKs signaling pathways. *Elsevier, Fish and Shellfish Immunology*. 86, 280–286.
  152. LI, W. – XIAOYING, Z. – ZEIQI, H. – YUNJIAO, C. – ZIJIN, L. – TIANMENG, M. – YIFENG, L. – YONG, C. (2020): In vitro and in vivo antioxidant activity of eucalyptus leaf polyphenols extract and its effect on chicken meat quality and cecum microbiota. *Food Research International*. 136, 109302.
  153. LITMAN, G.W. – RAST, J.P. – SHAMBLOTT, M.J. – HAIRE, R.N. – HULST, M. – ROESS, W. – LITMAN, R.T. – HINDS-FREY, K.R. – ZILCH, A. – AMEMIYA, C.T. (1993). Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Molecular Biology and Evolution*. 10, 60-72.
  154. LOTZ, M. – JIRIK, F. – KABOURIDIS, P. – TSOUKAS, P. – HIRANO, T. – KISHIMOTO, T. – CARSON, D.A. (1988): B cell stimulating factor 2/Interleukin 6 is a co-stimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 67, 1253–1268.
  155. LU, J. – IDRIS, U. – HARMON, B. – HOFACRE, C. – MAURER, J.J. – LEE, M.D. (2003): Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 6816-6824.
  156. LUCCHINI, F. – KMET, V. – CESENA, C – COPPI, L – BOTTAZZI, V. – MORELLI, L. (1998): Specific detection of a probiotic *Lactobacillus* strain in faecal samples by using multiplex PCR. *FEMS Microbiology Letters*. 158, 273-278.
  157. LUMSDEN, J.S. – OSTLAND, V.E. – BYRNE, P.J. – FERGUSON, H.W. (1993): Detection of a distinct gill-surface antibody response following horizontal infection and bath challenge of brook trout *Salvelinus fontinalis* with *Flavobacterium branchiophilum*, the causative agent of bacterial gill disease. *Disease of Aquatic Organism*. 16, 21–27.
  158. LYNN, D.J. – HIGGS, R. – LLOYD, A.T. – O’FARRELLY, C. – HERVE’-GRE’PINET, V. – NYS, Y. (2007). Avian beta-defensin nomenclature: a community proposed update. *Immunology Letters*. 110, 8689.

159. MA, X. – BI, S. – WANG, Y. – CHI, X. – HU, S. (2019): Combined adjuvant effect of ginseng stem-leaf saponins and selenium on immune responses to a live bivalent vaccine of Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus in chickens. *Poultry Science*. 98, 3548-3556.
160. MAGNADOTTIR, B. (2006): Innate immunity of fish (overview). *Fish and Shellfish Immunology*. 20, 137–151.
161. MAGNADOTTIR, B. (2010): Immunological control of fish diseases. *Journal of Marine Biotechnology*. 12, 361–379.
162. MAIER, V.H. – DORN, K.V. – GUDMUNDSDOTTIR, B.K. – GUDMUNDSSON, G.H. (2008): Characterisation of cathelicidin gene family members in divergent fish species. *Molecular Immunology*. 45, 3723–3730.
163. MANCABELLI, L. – FERRARIO, C. – MILANI, C. – MANGIFESTA, M. – TURRONI, F. – DURANTI, S. – LUGLI, G.A. – VIAPPIANI, A. – OSSIPRANDI, M.C. – VAN SINDEREN, D. (2016): Insights into the biodiversity of the gut microbiota of broiler chickens. *Environmental Microbiology*. 18, 4727–4738.
164. MARCHALONIS, J.J. (1977): *Immunity in Evolution*. Harvard University Press, Boston, MA.
165. MARKAZI, A.D. – PEREZ, V. – SIFRI, M. – SHANMUGASUNDARAM, R. – SELVARAJ, R.K. (2017): Effect of whole yeast cell product supplementation (CitriStim®) on immune responses and cecal microflora species in pullet and layer chickens during an experimental coccidial challenge. *Poultry Science*. 96, 2049–2056.
166. MARKUS, F.N. – SUSETTA, F. (2011): IL-6 signaling in autoimmunity, chronic inflammation and inflammation-associated cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 22, 83–89.
167. MARTÍNEZ, J.L. (2012): Natural antibiotic resistance and contamination by antibiotic resistance determinants: The two ages in the evolution of resistance to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*. 3.
168. MAURER, F. (1886): Schilddrüse und Thymus der Teleostier. *Morphologisches Jahrbuch*. 11, 129-175.
169. MEAD, G.C. – ADAMS, B.W. (1975): Some observations on the caecal microflora of the chick during the first two weeks of life. *British Poultry Science*. 16, 169-176.

170. MIKKELSEN, L. – BENDIXEN, C. – JAKOBSEN, M. – JENSEN, B. (2003): Enumeration of *Bifidobacteria* in Gastrointestinal Samples from Piglets. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 654-658.
171. MILIĆ, N. – MILANOVIC, M. – LETIĆ, N.G. – SEKULIĆ, M.T. – RADONIĆ, J. – MIHAJLOVIĆ, I. – MILORADOV, V. (2013): Occurrence of antibiotics as emerging contaminant substances in the aquatic environment. *International Journal of Environmental Health Research*. 23, 296–310.
172. MORALES-LOPEZ, R. – BRUFAU, J. (2013): Immune-modulatory effects of dietary *Saccharomices cerevisiae* cell wall in broiler chickens inoculated with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *British Poultry Science*. 54, 247–251.
173. MORENO, Y. – HERNÁNDEZ, M. – FERRÚS, M. – ALONSO-MOLINA, J. – BOTELLA, S. – MONTES, R. – HERNANDEZ, J. (2001): Direct detection of thermotolerant *Campylobacters* in chicken products by PCR and in situ hybridization. *Research in microbiology*. 152, 577-582.
174. MORRISON, R.N. – NOWAK, B. (2002): The antibody response of teleost fish. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 11, 46–54.
175. MUNYAKA, P.M. – ECHEVERRY, H. – YITBAREK, A. – CAMELO-JAIMES, G. – SHARIF, S. – GUENTER, W. – HOUSE, J.D. – RODRIGUEZ-LECOMPTE, J.C. (2012): Local and systemic innate immunity in broiler chickens supplemented with yeast-derived carbohydrates. *Poultry Science*. 91, 2164–2172.
176. NAGY, Z. – DAOOD, H. – KONCSEK, A. – MOLNÁR, H. – HELYES, L. (2017): The simultaneous determination of capsaicinoids, tocopherols, and carotenoids in pungent pepper powder. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*. 40, 199–209.
177. NEMES, A. – SZÖLLŐSI, E. – STÜNDL, L. – BIRÓ, A. – HOMOKI, J.R. – SZARVAS, M.M. – BALOGH, P. – CZIÁKY, Z. – REMENYIK, J. (2018): Determination of flavonoid and proanthocyanidin profile of Hungarian sour cherry. *Molecules*. 2, 23, 3278.
178. NIU, Z.Y. – LIU, F.Z. – YAN, Q.L. – LI, W.C. (2009): Effects of different levels of vitamin E on growth performance and immune responses of broilers under heat stress. *Poultry Science*. 88, 2101–2107.
179. NOVAK, M. – VETVICKA, V. (2008):  $\beta$ -Glucans, history, and the present: Immunomodulatory aspects and mechanisms of actions. *Journal of Immunotoxicology*. 5, 47-57.

180. OAKLEY, B.B. – KOGUT, M.H. (2016): Spatial and Temporal Changes in the Broiler Chicken Cecal and Fecal Microbiomes and Correlations of Bacterial Taxa with Cytokine Gene Expression. *Frontiers Veterinary Sciences*. 3, 11.
181. OAKLEY, B.B. – LILLEHOJ, H.S. – KOGUT, M.H. – KIM, W.K. – MAURER, J.J. – PEDROSO, A. – LEE, M.D. – COLLETT, S.R. – JOHNSON, T.J. – COX, N.A. (2014): The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letter*. 360, 100–112.
182. OLÁH, I. – VERVELDE, L. (2008): Structure of the Avian Lymphoid System. In: *Avian Immunology*. Szerk. DAVISON F., KASPERS B., SCHAT K.A., Elsevier, London, UK, 13-50.
183. OLANREWAJU, H.A. – THAXTON, J.P. – DOZIER, W.A. III. – PURSWELL, J. – ROUSH, W.B. – BRANTON, S.L. (2006): A review of lightning programs for broiler production. *International Journal of Poultry Science*. 4, 301–308.
184. ONDERKA, D.K. – LANGEVIN, C.C. – HANSON, J.A. (1990): Fibrosing cholehepatitis in broiler chickens induced by bile duct ligations or inoculation of *Clostridium perfringens*. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. 54, 285–290.
185. ORLANS, E. – ROSE, M.E. (1972): An IgA-like immunoglobulin in the fowl. *Immunochemistry*. 9, 833-838.
186. PANDIYAN P. – BALARAMAN, D. – THIRUNAVUKKARASU, R. – EDWARD, G.J.G. – SUBRAMANIAN, K. – MANIKKAM, S. – SADAIAPPAN, B. (2013): Probiotics in aquaculture. *Drug Invention Today*. 5, 55–59. 10.1016/j.dit.2013.03.003.
187. PAN, D. – YU, Z. (2014): Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*. 5, 108-119.
188. PETRIE-HANSON, L. – AINSWORTH, A.J. (2000): Differential cytochemical staining characteristics of channel catfish leukocytes identify cell populations in lymphoid organs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 73, 129–144.
189. PFAFFL, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29, 2002–2007.
190. POURABEDIN, M. – CHEN, Q. – YANG, M. – ZHAO, X. (2017): Mannan- and xylooligosaccharides modulate caecal microbiota and expression of inflammatory-related cytokines and reduce caecal *Salmonella enteritidis* colonization in young chickens. *FEMS Microbiology Ecology*. 93, 1–11.

191. POURHOSSEIN Z., QOTBI A. A. A., SEIDAVI A., LAUDADIO V., CENTODUCATI G., TUFARELLI, V. (2015): Effect of different levels of dietary sweet orange (*Citrus sinensis*) peel extract on humoral immune system responses in broiler chickens. *Animal Science Journal*. 86, 105-110.
192. PRESS, C.M. – DANNEVIG, B.H.- LANDSVERK, T. (1994): Immune and enzyme histochemical phenotypes of lymphoid and nonlymphoid cells within the spleen and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish and Shellfish Immunology*. 4, 79–93
193. PROMYA, J. – CHITMANAT, C. (2011): The effects of *Spirulina platensis* and *Cladophora* algae on the growth performance, meat quality and immunity stimulating capacity of the African sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*). *International Journal of Agriculture and Biology*. 13, 77–82.
194. PUENTE, J.L. – FINLAY, B.B. (2001): Pathogenic *Escherichia coli*. In: Principles of bacterial pathogenesis. Szerk. Groisman E.A, Academic Press, San Diego, California. 387- 456.
195. RAJPUT, N. – NAEEM, M. – ALI, S. – ZHANG, J.F. – ZHANG, L. – WANG T. (2013): The effect of dietary supplementation with the natural carotenoids curcumin and lutein on broiler pigmentation and immunity. *Poultry Science* 92, 1177–1185.
196. RATCLIFFE, M.J.H. (2006): Antibodies, immunoglobulin genes and the bursa of Fabricius in chicken B cell development. *Developmental & Comparative Immunology*. 30, 101-118.
197. RATHGEBER, B.M. – BUDGELL, K.L. – MACLSAAC, J.L. – MIRZA, M.A. – DONCASTER, K.L. (2008): Growth performance and spleen and bursa weight of broilers fed yeast beta-glucan. *Canadian Journal of Animal Science*. 88, 469–473.
198. REZAEI, S. – JAHROMI, M.F. – LIANG, J.B. – ZULKIFLI, I. – FARJAM, A.S. – LAUDADIO, V. – TUFARELLI, V. (2015): Effect of oligosaccharides extract from palm kernel expeller on growth performance, gut microbiota and immune response in broiler chickens. *Poultry Science*. 94, 2414-2420.
199. ROMBOUT, J.H. – BLOK, L.J. – LAMERS, C.H.J. (1986): Immunization of carp (*Cyprinus carpio*) with a *Vibrio anguillarum* bacterin: Indications for a common mucosal immune system. *Developmental and Comparative Immunology*. 10, 341–351.

200. ROMBOUT, J.H. – HUTTENHUIS, H.B.T. – PICCHIETTI, S. – SCAPIGLIATI, S. (2005): Phylogeny and ontogeny of fish leucocytes. *Fish and Shellfish Immunology*. 19, 441–455.
201. ROMBOUT, J.H. – TAVERNE, N. – VAN DE KAMP, M. – TAVERNE-THIELE, A.J. (1993): Differences in mucus and serum immunoglobulin of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Developmental and Comparative Immunology*. 17, 309–317.
202. ROSSI, M. – AMARETTI, A. (2010): Probiotic properties of *Bifidobacteria*, Horizon Scientific Press. Rowan House, UK. 97-124.
203. SAEIJ, J.P. – STET, R.J. – DE VRIES, B.J. – VAN MUISWINKEL, W.B. – WIEGERTJES, G.F. (2003): Molecular and functional characterization of carp TNF: a link between TNF polymorphism and trypanotolerance? *Developmental & Comparative Immunology*. 27, 29–41.
204. SAKAI, M. – TANIGUCHI, K. – MAMOTO, K. – OGAWA, H. – TABATA, M. (2001): Immunostimulant effects of nucleotide isolated from yeast RNA on carp, *Cyprinus carpio* L. *Journal of Fish Disease*. 24, 433–438.
205. SALIM, H.M. – KANG, H.K. – AKTER, N. – KIM, D.W. – KIM, J.H. – KIM, M.J. – NA, J.C. – JONG, H.B. – CHOI, H.C. – SUH, O.S. (2013): Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. *Poultry Science*. 92, 2084–2090.
206. SAMAVAT, Z. – MEHRGAN, M.S. – JAMILI, S. – SOLTANI, M. – SHEKARABI, S.P.H. (2019): Determination of grapefruit (*Citrus paradisi*) peel extract bio-active substances and its application in Caspian white fish (*Rutilus frisii kutum*) diet: Growth, haemato-biochemical parameters and intestinal morphology. *Aquaculture Research*. 50, 2496-2504.
207. SAURABH, S. – SAHOO, P.K. (2008): Lysozyme: an important defence molecule of fish innate immune system. *Aquaculture Research*. 39, 223–239.
208. SAVAN, R. – IGAWA, D. – SAKAI, M. (2003): Cloning, characterization and expression analysis of interleukin-10 from the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *European Journal of Biochemistry*. 270, 4647–4654.
209. SECOMBES, C.J. (2008): Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish and Shellfish Immunology*. 25, 409–416.

210. SECOMBES, C.J. – FLETCHER, T.C. (1992): The role of phagocytes in the protective mechanisms of fish. *Annual Review of Fish Disease*. 2, 53–71.
211. SECOMBES, C.J. – WANG, T. – HONG, S. – PEDDIE, S. – CRAMPE, M. – LAING, K.J. – CUNNINGHAM, C. – ZOU, J. (2001): Cytokines and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*. 25, 713-723.
212. SEKELICK, M.J. – FERRANDINO, A.F. – HOPKINS, D.A. – MARCUS, P.I. (1994): Chicken interferon gene: cloning, expression, and analysis. *Journal of Interferon Research*. 14, 71–79.
213. SELVARAJ, R.K. – KOUTSOS, E.A. – CALVERT, C.C. – KLASING, K.C. (2006): Dietary lutein and fat interact to modify macrophage properties in chicks hatched from carotenoid-deplete or replete eggs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 90, 70–80.
214. SHANG, Y. – REGASSA, A. – KIM, J.H. – KIM, W.K. (2015): The effect of dietary fructooligosaccharide supplementation on growth performance, intestinal morphology, and immune responses in broiler chickens challenged with *Salmonella Enteritidis* lipopolysaccharides. *Poultry Science*. 94, 2887–2897.
215. SHANMUGASUNDARAM, R. – SIFRI, M. – JEYABALAN, R. – SELVARAJ, R.K. (2014): Effect of yeast cell product (CitriStim) supplementation on turkey performance and intestinal immune cell parameters during an experimental lipopolysaccharide injection<sup>1</sup>. *Poultry Science*. 93, 2763-2771.
216. SHANMUGASUNDARAM, R. – SIFRI, M. – SELVARAJ, R.K. (2013): Effect of yeast cell product (CitriStim) supplementation on broiler performance and intestinal immune cell parameters during an experimental coccidial infection. *Poultry Science*. 92, 358–363.
217. SHANMUGASUNDARAM, R. – SELVARAJ, R.K. (2011): Regulatory T cell properties of chicken CD4+CD25+ cells. *Journal of Immunology*. 186, 1997–2002.
218. SHAO, Y. – WANG, Z. – TIAN, X. – GUO, Y. – ZHANG, H. (2016): Yeast  $\beta$ -d-glucans induced antimicrobial peptide expressions against *Salmonella* infection in broiler chickens. *International Journal of Biological Macromolecules*. 85, 573–584.
219. SHARMA, J.M. (1991): Overview of the avian immune system. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 30, 13-17.

220. SHASHIDHARA, R.G. – DEVEGOWDA, G. (2003): Effect of dietary mannanoligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. *Poultry Science*. 82, 1319–1325.
221. SHEN, L. – STUGE, T.B. – ZHOU, H. – KHAYAT, M. – BARKER, K.S. – QUINIQU, S.M. – WILSON, M. – BENGTEN, E. – CHINCHAR, V.G. – CLEM, L.W. – MILLER, N.W. (2002): Channel catfish cytotoxic cells: a mini-review. *Developmental and Comparative Immunology*. 26, 141–149.
222. SHEN, Y.B. – PIAO, X.S. – KIM, S.W. – WANG, L. – LIU, P. – YOON, I. – ZHEN, Y.G. (2009): Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *Journal of Animal Science*. 287, 2614–2624.
223. SHEORAN, N. – SIHAG, S. – MAAN, N.S. (2017): Expression analysis of immunity related genes in White Leghorn layers supplemented with probiotics and prebiotics. *Journal of Pharmaceutical Innovation*. 6, 14–18
224. SHEPARD, K.L. (1994): Functions for fish mucus. *Reviews in Fish Biology Fisheries*. 4, 401–429.
225. SHI, L. – FENG, L. – JIANG, W.D. – LIU, Y. – JIANG, J. – WU, P. (2016): Immunity decreases, antioxidant system damages and tight junction changes in the intestine of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) during folic acid deficiency: regulation of NF- $\kappa$ B, Nrf2 and MLCK mRNA levels. Elsevier, *Fish and Shellfish Immunology*. 51, 405-419.
226. SHIMIZU, M. – WATANABE, Y. – ISOBE, N. – YOSHIMURA, Y. (2008): Expression of avian beta-defensin 3, an antimicrobial peptide, by sperm in the male reproductive organs and oviduct in chickens: an immunohistochemical study. *Poultry Science*. 87, 2653–2659.
227. SHU, G. – KONG, F. – XU, D. – YIN, L. – HE, C. – LIN, J. – FU, H. – WANG, K. – TIAN, Y. – ZHAO, X. (2020): Bamboo leaf flavone changed the community of cecum microbiota and improved the immune function in broilers. *Scientific Reports*. 10.
228. SICK, C. – SCHULTZ, U. – STAEHEL, P. (1996): A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. *Journal of Biology and Chemistry*. 271, 7635–7639.
229. SIGH, J. – LINDENSTRÖM, T. – BUCHMANN, K. (2004): Expression of proinflammatory cytokines in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during an

- infection with *Ichthyophthirius multifiliis*. Elsevier, Fish and Shellfish Immunology. 17, 75–86.
230. SIMON, A. – JÁVOR, A. – BAI, P. – OLÁH, J. – CZEGLÉDI, L. (2018): Reference genes selection for reverse transcription quantitative polymerase chain reaction in chicken hypothalamus under different feeding status. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 102, 286–296
231. SONG, J. – LEI, X. – LUO, J. (2019): The effect of Epigallocatechin-3-gallate on small intestinal morphology, antioxidant capacity and anti-inflammatory effect in heatstressed broilers. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 103, 1030–1038.
232. SORURI, A. – GRIGAT, J. – FORSSMANN, U. – RIGGERT, J. – ZWIRNER, J. (2007): bdefensins chemoattract macrophages and mast cells but not lymphocytes and dendritic cells: CCR6 is not involved. European Journal of Immunology. 37, 2474-2486.
233. STANLEY, D. – GEIER, M.S. – DENMAN, S.E. – HARING, V.R. – CROWLEY, T.M. – HUGHES, R.J. – MOORE, R.J. (2013): Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. Veterinary Microbiology. 164.
234. SURESH, P. – ARP, L.H. – HUFFMAN, E.L. (1994). Mucosal and systemic humoral immune response to *Bordetella avium* in experimentally infected turkeys. Avian Diseases. 38, 225-230.
235. SUZUMOTO, B.K. – SCHRECK, C.B. – MCLNTYRE, J.D. (1997): Relative resistances of three transferrin genotypes of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and their hematological responses to bacterial kidney disease. Journal of the Fisheries Research Board of Canada. 34, 1–8.
236. SVEINBJORNSSON, B. – OLSEN, R. – PAULSEN, S. (1996): Immunocytochemical localization of lysozyme in intestinal eosinophilic granule cells (EGCs) of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. Journal of Fish Disease. 19, 349–355.
237. SYMEON, G. K. – ZINTILAS, C. – DEMIRIS, N. – BIZELIS, I. A. – DELIGEORGIS, S. G. (2010): Effects of Oregano Essential Oil Dietary Supplementation on the Feeding and Drinking Behaviour as Well as the Activity of Broilers. International Journal of Poultry Science. 9, 401-405.

238. TACHIBANA, K. – YAGI, M. – HARA, K. – MISHIMA, T. – TSUCHIMOTO, M. (1997): Effects of feeding b-carotene supplemented rotifers on survival and lymphocyte proliferation reaction of fish larvae of Japanese parrotfish (*Oplegnathus fasciatus*) and Spotted parrotfish (*Oplegnathus punctatus*): preliminary trials. *Hydrobiologia*. 358, 313–316.
239. TAMURA, T. – YANAI, H. – SAVITSKY, D. – TANIGUCHI, T. (2008): The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis. *Annual Review of Immunology*. 26, 535–584.
240. TAN, J. – LIU, S. – GUO, Y. – APPELEGATE, T.J. – EICHER, S.D. (2014): Dietary L-arginine supplementation attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response in broiler chickens. *British Journal of Nutrition*. 111, 1394–1404.
241. TEROVA, G. – DÍAZ, N. – RIMOLDI, S. – CECCOTTI, C. – GLIOZHENI, E. – PIFERRER, F. (2016): Effects of Sodium Butyrate Treatment on Histone Modifications and the Expression of Genes Related to Epigenetic Regulatory Mechanisms and Immune Response in European Sea Bass (*Dicentrarchus Labrax*) Fed a Plant-Based Diet. *PLoS ONE*. 11, e0160332.
242. TORRECILLAS, S. – MAKOL, A. – CABALLERO, M.J. – MONTERO, D. – GINÉS, R. – SWEETMAN, S. – IZQUIERDO, M. (2011): Improved feed utilization, intestine mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) feed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*. 17, 223-233.
243. TORRISSEN O. J. (1984): Pigmentation of salmonids: effects of carotenoids in eggs and start-feeding diet on survival and growth rate. *Aquaculture*. 43, 185-193.
244. TREDE, N.S. – ZAPATA, A. – ZON, L.I. (2001): Fishing for lymphoid genes. *Trends in Immunology* 22, 302–307.
245. TULIO, A.Z. Jr – REESE, R.N. – WYZGOSKI, F.J – RINALDI, P.L. – FU, R – SCHEERENS, J.C. – MILLER, A.R. (2008): Cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-xylosylrutinoside as primary phenolic antioxidants in black raspberry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 1880–1888.
246. URÁN, P.A. – GONÇALVES, A.A. – TAVERNE-THIELE, J.J. – SCHRAMA, J.W. – VERRETH, J.A.J. – ROMBOUT, J.H.W.M. (2008): Soybean meal induces intestinal inflammation in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Fish & Shellfish Immunology*. 25, 751-760.

247. URIBE, C. – FOLCH, H. – ENRIQUEZ, R. – MORAN, G. (2011): Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. *Veterinarni Medicina*. 56, 486-503.
248. VALLEJOS-VIDAL, E. – LÓPEZ-REYES, F. – TELES, M. – MACKENZIE, S. (2016): The response of fish to immunostimulant diets. *Fish & Shellfish Immunology*. 56, 34-69.
249. VAN ROOIJEN, N. (1990): Antigen processing and presentation in vivo: the microenvironment as a crucial factor. *Immunology Today*. 11, 436-439.
250. VARGA, J. – TUBOLY, S. – MÉSZÁROS, J. (2007): Háziállatok fertőző betegségei (Állatorvosi járványtan II.). Mezőgazda Kiadó. Budapest. 522 p.
251. VETVICKA, V. – OLIVEIRA, C. (2014):  $\beta(1-3)(1-6)$ -D-Glucan with Strong Effects on Immune Status in Chicken: Potential Importance for Efficiency of Commercial Farming. *Journal of Nutrition and Health Sciences*. 1, 309.
252. WANG, R.F. – CAO, W.W. – CERNIGLIA, C.E. (1996): PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 1242–1247.
253. WANG, Y. – WU, C. – ZHANG, Q. – QI, J. – LIU, H. – WANG, Y. – HE, T. (2012): Identification of New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase 1 in *Acinetobacter lwoffii* of food animal origin. *PLoS ONE*. 7, e37152.
254. WANG, J.L. – MENG, X. – LU, R. – WU, C. – LUO, Y.T. – YAN, X. – LI, X.J. – KONG, X.H. – NIE, G.X. (2015): Effects of *Rehmannia glutinosa* on growth performance, immunological parameters and disease resistance to *Aeromonas hydrophila* in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Aquaculture*. 435, 293-300.
255. WANG, W. – LI, Z. – REN, W. – YUE, Y. – GUO, Y. (2016): Effects of live yeast supplementation on lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in broilers. *Poultry Science*. 95, 2557–2564.
256. WHYTE, S.K. (2007): The innate immune response of finfish – A review of current knowledge. *Fish and Shellfish Immunology*. 23, 1127–1151.
257. WILSON, M.R. – WARR, G.W. (1992): Fish immunoglobulins and the genes that encode them. *Annual Review of Fish Disease*. 2, 201–221.
258. WILSON, M.R. – BENGTON, E. – MILLER, N. – CLEM, L.W. – DU PASQUIER, L. – WARR, G.W. (1997): A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 4593–4597.

259. WYLLIE, A.H. – KERR, J.F. – CURRIE, A.R. (1980): Cell death: The significance of apoptosis. *International Review of Cytology*. 68, 251–306.
260. WITHANAGE, G.S.K. – WIGLEY, P. – KAISER, P. – MASTROENI, P. – BROOKS, H. – POWERS, C. – BEAL, R. – BARROW, P. – MASKELL, D. – MCCONNELL, I. (2005): Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. *Infection and Immunity*. 73, 5173-5182.
261. WU, Q.J. – WANG, Y.Q. – QI, Y.X. (2017): Influence of procyanidin supplementation on the immune responses of broilers challenged with lipopolysaccharide. *Journal of Animal Science*. 88, 983–990.
262. WU, Y. – WANG, S. – PENG, X. (2003): Serum acute phase response (APR)-related proteome of loach to trauma. *Fish and Shellfish Immunology*. 16, 381–389.
263. WUNDERLICH, L. (2014): Molekuláris biológiai technikák. Typotex Kiadó, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem, Semmelweis Egyetem. 73-81, 179-180.
264. XU, Z.R. – HU, C.H. – XIA, M.S. – ZHAN, X.A. – WANG, M.Q. (2003): Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Science*. 82, 1030–1036.
265. YAN, F. – MO, X. – LIU, J. – YE, S. – ZENG, X. – CHEN, D. (2017): Thymic function in the regulation of T cells, and molecular mechanisms underlying the modulation of cytokines and stress signaling (Review). *Molecular Medicine Reports*. 16, 7175–7184.
266. YANAR, Y. – BUYUKCHAPAR, H. – YANAR, M. – GOCER, M. (2007): Effects of carotenoids from red pepper and marigold flower on pigmentation, sensory properties and fatty acid composition of rainbow trout. *Food Chemistry*. 100, 326–330.
267. YANG, Y. – IJI, P.A. – KOCHER, A. – MIKKELSEN, L.L. – CHOCT, M. (2008): Effects of mannanoligosaccharide and fructooligosaccharide on the response of broilers to pathogenic *Escherichia coli* challenge. *British Poultry Science*. 49, 550–559.

268. YE, J. – COULOURIS, G. – ZARETSKAYA, I. – CUTCUTACHE, I. – ROZEN, S. – MADDEN, T.L. (2012): Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*. 13, 134.
269. YILMAZ, E. (2019a): Effects of dietary anthocyanin on innate immune parameters, gene expression responses, and ammonia resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Fish & Shellfish Immunology*. 93, 694–701.
270. YILMAZ, S. (2019b): Effects of dietary blackberry syrup supplement on growth performance, antioxidant, and immunological responses, and resistance of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) to *Plesiomonas shigelloides*. *Fish & Shellfish Immunology*. 84, 1125-1133.
271. YIN, G. – ARDÓ, L. – THOMPSON, K.D. – ADAMS, A. – JENEY, Z. – JENEY, G. (2009): Chinese herbs (*Astragalus radix* and *Ganoderma lucidum*) enhance immune response of carp, *Cyprinus carpio*, and protection against *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*. 26, 140-145.
272. YUAN, L. – LI, W. – HUO, Q. – DU, C. – WANG, Z. – YI, B. – WANG, M. (2018): Effects of xylo-oligosaccharide and flavomycin on the immune function of broiler chickens. *PeerJ*. DOI: 10.7717/peerj.4435.
273. YUJI-SADO, R. – RAULINO-DOMANSKI, F. – FRANCHI DE FREITAS, P. – BAIOCO-SALES, F. (2015): Growth, immune status and intestinal morphology of Nile tilapia fed dietary prebiotics (mannan oligosaccharides-MOS). *Latin American Journal of Aquatic Research*. 43, 944-952.
274. YOUSEFI, S. – HOSSEIN HOSEINIFAR, S. – PAKNEJAD, H. – HAJIMORADLO, A. (2018): The effects of dietary supplement of galactooligosaccharide on innate immunity, immune related genes expression and growth performance in zebrafish (*Danio rerio*). Elsevier, *Fish and Shellfish Immunology*. 73, 192–196.
275. ZAPATA, A. – DIEZ, B – CEJALVO, T – GUTIERREZ-DE FRIAS, C. – CORTES, A. (2006): Ontogeny of the immune system of fish. *Fish and Shellfish Immunology*. 20, 126-136.
276. ZHANG, B. – GUO, Y. – WANG, Z. (2008): The modulating effect of  $\beta$ -1,3/1,6-glucan supplementation in the diet on performance and immunological responses of broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Science*. 21, 237–244.
277. ZHANG, X. – ZHAO, L. – CAO, F. – AHMAD, H. – WANG, G. – WANG, T. (2013): Effects of feeding fermented *Ginkgo biloba* leaves on small intestinal

- morphology, absorption, and immunomodulation of early lipopolysaccharide-challenged chicks. *Poultry Science*. 92, 119–130.
278. ZHOU, M. – TAO, Y. – LAI, C. – HUANG, C. – ZHOU, Y. – YONG, Q. (2019): Effects of Mannan oligosaccharide Supplementation on the Growth Performance, Immunity, and Oxidative Status of Partridge Shank Chickens. *Animals*. 9, 817.
279. ZHOU, Q.C. – BUENTELLO, J.A. – GATLIN, D.M. (2010): Effects of dietary prebiotics on growth performance, immune response and intestinal morphology of red drum (*Sciaenops ocellatus*). *Aquaculture*, 309, 253-257.
280. ZOU, H.K. – HOSEINIFAR, S.H. – MIANDARE, H.M. – HAJIMORADLOO, A. (2016): *Agaricus bisporus* powder improved cutaneous mucosal and serum immune parameters and up-regulated intestinal cytokines gene expression in common carp (*Cyprinus carpio*) fingerlings. *Fish & Shellfish Immunology*. 58, 380-386.

Internet:

EUROPEAN COMMISSION (2015): Antimicrobial in agriculture and the environment: Reducing unnecessary use and waste. The review on antimicrobial resistance. Chaired by Jim O’Neill.

[https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/antimicrobial\\_resistance/docs/amr\\_studies\\_2015\\_am-in-agri-and-env.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_studies_2015_am-in-agri-and-env.pdf) (2020.12.20)

EUROPEAN MEDICINES AGENCY (2018): Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2018.

[https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/report/sales-veterinary-antimicrobial-agents-31-european-countries-2018-trends-2010-2018-tenth-esvac-report_en.pdf) (2020.12.12.)

# PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/124/2022.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Csernus Brigitta  
Doktori Iskola: Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10058419

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

### Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

1. **Csernus, B.**, Biró, S., Babinszky, L., Stündl, L., Gálné Remenyik, J., Pesti-Asbóth, G., Oláh, J., Czeglédi, L.: The effect of  $\beta$ -glucan, carotenoids, oligosaccharides and anthocyanins on bacteria groups of excreta in broiler chickens.  
*Acta agraria Debreceniensis. [Epub ahead of print]*, 1-6, 2022. ISSN: 1587-1282.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.34101/ACTAAGRAR/1/10639>
2. **Csernus, B.**, Biró, S., Stündl, L., Gálné Remenyik, J., Bai, P., Fehér, M., Minya, D., Czeglédi, L.: Effects of bioactive plant extracts on immune-related gene expression of common carp (*Cyprinus carpio*).  
*Acta agraria Debreceniensis. 2*, 49-56, 2020. ISSN: 1587-1282.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.34101/ACTAAGRAR/2/8260>

### Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

3. **Csernus, B.**, Biró, S., Babinszky, L., Komlósi, I., Jávora, A., Stündl, L., Gálné Remenyik, J., Bai, P., Oláh, J., Pesti-Asbóth, G., Czeglédi, L.: Effect of Carotenoids, Oligosaccharides and Anthocyanins on Growth Performance, Immunological Parameters and Intestinal Morphology in Broiler Chickens Challenged with *Escherichia coli* Lipopolysaccharide.  
*Animals (Basel). 10* (347), 1-20, 2020. ISSN: 2076-2615.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/ani10020347>  
IF: 2.752
4. **Csernus, B.**, Czeglédi, L.: Physiological, antimicrobial, intestine morphological, and immunological effects of fructooligosaccharides in pigs.  
*Arch. Anim. Breed. 63* (2), 325-335, 2020. EISSN: 2363-9822.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.5194/aab-63-325-2020>  
IF: 1.528





Magyar nyelvű konferencia közlemények (1)

5. **Csernus, B.**, Biró, S., Stündl, L., Gálné Remenyik, J., Fehér, M., Ozsváth, X. E., Czeglédi, L.:  
Bioaktív növényi kivonatok hatása a ponty intesztinális morfológiai paramétereire.  
In: XXIV. Tavaszi Szél Konferencia 2021 : Tanulmánykötet I.. Szerk.: Molnár Dániel, Molnár  
Dóra, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 93-98, 2021. ISBN: 9786158199117

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (2)

6. **Csernus, B.**, Biró, S., Gálné Remenyik, J., Fehér, M., Czeglédi, L.: Effects of bioactive plant  
extracts on immune-related gene expression of common carp (*Cyprinus carpio*).  
In: XVII. Nemzetközi Tudományos Napok "Környezeti, gazdasági és társadalmi kihívások  
2020 után" : Abstract Book. Szerk.: Bujdosó Zoltán, Dinya László, Csernák József,  
Eszterházy Károly Egyetem, Gyöngyös, 70, 2020. ISBN: 9789634961567(online)
7. **Csernus, B.**, Simon, Á., Gálné Remenyik, J., Ozsváth, X. E., Czeglédi, L.: Effects of bioactive  
compounds on interleukin expression of chicken.  
In: Arcsal vagy háttal a jövőnek? : LX. Georgikon Napok, Pannon Egyetem, Keszthely, 40,  
2018. ISBN: 9789639639911

### További közlemények

Magyar nyelvű konferencia közlemények (1)

8. Ozsváth, X. E., Szabó, C., Oláh, J., **Csernus, B.**, Czeglédi, L.: A timol hatása a japánfűrj (*Coturnix  
japonica*) vérbiokémiái paramétereire.  
In: XXIV. Tavaszi Szél Konferencia 2021 : Tanulmánykötet I.. Szerk.: Molnár Dániel, Molnár  
Dóra, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 55-59, 2021. ISBN:  
9786158199117

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (2)

9. **Csernus, B.**, Czeglédi, L., Szabó, C., Babinszky, L.: A hőstressz hatása a sertés hősokk-  
fehérjéinek és a gyulladáshoz vezető faktorainak génexpressziójára.  
In: Vidékgazdasági és fenntarthatósági kutatások aktuális eredményei : absztraktkötet  
Szerk.: Jávor András, Debreceni Egyetem, Debrecen, 12-13, 2020. ISBN: 9789634902775
10. Czeglédi, L., Simon, Á., **Csernus, B.**, Tisza, Á., Ozsváth, X. E., Csósz, É., Gulyás, G.: A hipofízis  
adenilát cikláz aktiváló polipeptid előfordulása tejelő tehének plazmájában. Occurrence of  
pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the plasma of dairy cows  
In: XXXVII. Óvári Tudományos Nap, Fenntartható agrárium és környezet, az Óvári Akadémia  
200 éve - múlt, jelen, jövő, Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és  
Élelmiszertudományi Kar, Mosonmagyaróvár, 90-91, 2018. ISBN: 9786155837142



Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (1)

11. Czeglédi, L., Gulyás, G., **Csernus, B.**, Simon, Á.: Development of dna methods for the identification of food substitution by poultry species in meat and processed meat products.  
In: 9th Central European Congress on Food, Food Science for Well-being. Ed.: Ovidiu Tița, "Vasile Goldis" University Press, Arad, 83, 2018. ISBN: 9786061215461

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 4,28**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):  
4,28**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2022.03.25.



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Czeglédi Levente** egyetemi tanárnak, kutatómunkám elméleti háttérének megalapozásáért, az elmúlt évek során nyújtott szakmai segítségéért, a kutatások elvégzéséhez szükséges feltételek biztosításáért, valamint kitartó bizalmáért és támogatásáért.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Komlósi István** és **Dr. Jávor András** professzor uraknak, amiért laboratóriumi munkám során az **Állattenyésztési Tanszék** laboratóriumában, valamint az **Állatgenetikai Laboratóriumban** dolgozhattam.

Köszönettel tartozom **Dr. Babinszky László** professzor úrnak, a takarmányozás területén és a publikációk készítése során nyújtott szakmai segítségéért és támogatásáért.

Hálás köszönettel tartozom **Gálné Dr. Remenyik Judit** tudományos főmunkatársnak, valamint az Élelmiszertechnológiai Intézet kutatócsoportjának a növényi kivonatok előállításáért. Kiemelt köszönet illeti **Pesti-Asbóth Georginát** a laboratóriumi munka során nyújtott hasznos tanácsaiért.

Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Oláh János** tudományos munkatársnak, az Állattenyésztési Kísérleti Telepen beállított kísérletekben nyújtott segítségéért. Köszönettel tartozom továbbá a Telepen dolgozó valamennyi **Munkatárs** segítségéért.

Szeretném megköszönni **Dr. Pálfyné Dr. Vass Nóra** állatorvosnak a madarak oltása során nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom **Dr. Fehér Milán** tudományos munkatársnak és a Halbiológiai Laboratórium Munkatársainak a ponttyal beállított kísérlet során nyújtott segítségéért.

Hálával tartozom **Dr. Bai Péter** (DE-ÁOK Orvosi Vegytani Intézet) professzor úrnak, amiért vizsgálataim elvégzéséhez korszerű qPCR gépüket használhattam. Megköszönöm a szövettani metszetek festését **Dr. Mészár Zoltánnak** (DE-ÁOK, Anatómiai-, Szövet- és Fejlődéstani Intézet) és **Dr. Németh Józsefnek** (DE-ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet).

Köszönet illeti kolléganőmet, **Ozsváth Xénia Erika** PhD hallgatót a laboratóriumi munkák során nyújtott segítségéért. Megköszönöm az **Állattenyésztési Tanszéken** dolgozó Kollégák együttműködését.

Hálás köszönettel tartozom **Családomnak** és **Barátaimnak**, támogatásukért és türelmükért.

Az értekezés elkészítését a **GINOP-2.3.2-15-2016-00042**, valamint az **EFOP 3.6.3-VEKOP-16-2017-00008** számú projektek támogatták. A projektek az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társ-finanszírozásával valósultak meg. A dolgozat megírását továbbá az **Új Nemzeti Kiválóság Program (ÚNKP)** segítette. A program az Innovációs és Technológiai Minisztérium társ-finanszírozásával valósult meg.

## MELLÉKLETEK

1. melléklet

### A vegyszerek jegyzéke

Vegyszer neve	Gyártó
AccuGENE, RNáz-, Dnáz mentes víz	Lonza
Agaróz	Lonza
dinátrium-hidrogénfoszfát-dodekahidrát	Sigma-Aldrich
DirectZol™ RNA MiniPrep Kit	Zymo Research
dNTP	VWR
DreamTaq Hot-Start DNA Polymerase kit	Thermo Fischer Scientific
ecetsav	Sigma-Aldrich
<i>Escherichia coli</i> O55:B5 lipopoliszacharid	Sigma-Aldrich
etanol	Molar
etilén-diamin-tetraecetsav (EDTA)	VWR
E.Z.N.A.® Stool DNA Kit	Omega Bio-tek
fiziológiás sóoldat	B.Braun
formalin oldat	Sigma-Aldrich
GeneRuler 100 bp DNS marker	Thermo Fischer Scientific
hangyasav	Sigma-Aldrich
HOT FIREPoI EvaGreen qPCR Supermix	Solys BioDyne
HPLC pigment reagens	Merck
kálium-dihidrogén-foszfát	Sigma-Aldrich
kálium-klorid	Sigma-Aldrich
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fischer Scientific
metanol	Sigma-Aldrich
nátrium-borohidrid	Sigma-Aldrich
nátrium-klorid	Sigma-Aldrich
oligonukleotid primerek	Integrated DNA Technologies
QnD chicken ELISA Kit	Xinqidi Biological Technology
qPCRBIO cDNA Synthesis Kit	PCR Biosystems
trifluorecetsav	Sigma-Aldrich
tris	VWR
TRI Reagens	Thermo Fischer Scientific
Xceed qPCR SG Hi-ROX Mastermix	Institute of Applied Biotechnologies

## **NYILATKOZATOK**

### **NYILATKOZAT**

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (Ph.D.) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2022. ....

.....

A jelölt aláírása

### **NYILATKOZAT**

Tanúsítom, hogy Csernus Brigitta doktorjelölt 2017-2021 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2022. ....

.....

A témavezető aláírása