

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**

**Bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke és a ponty immunológiai paramétereire, az intesztinális morfológiára és a mikrobiotára**

Csernus Brigitta

Témavezető: Dr. Czeglédi Levente  
*Ph.D.*



**DEBRECENI EGYETEM**  
**Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola**

Debrecen, 2022.



## 1. A doktori értekezés előzményei és célkitűzései

A gazdasági állatfajok egészségi állapotát és termelését számos betegség veszélyezteti, melyek közül a bakteriális eredetű fertőzéseket 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 fogyasztókhoz 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 a 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 kerül a szervezetbe. Szerepük a sejtkommunikáció szabályozásában 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, a mikrobiota összetételét, valamint a táplálóanyagok hasznosulását – ebből adódóan, képesek lehetnek a gazdaszervezet immunitásának fokozására.

## CÉLKITŰZÉS

Kutatásunk során célul tűztük ki az általunk alkalmazott karotinoidok, oligoszacharidok és antocianinok hatásának vizsgálatát, amiket az alábbi pontok foglalnak össze:

### **Brojlercsirkevel végzett vizsgálatok:**

1. Meghatározzuk a karotinoidok, az oligoszacharidok és az antocianinok hatását a brojlercsirke bizonyos termelési paramétereire (élő súly, átlagos napi súlygyarapodás, átlagos napi takarmányfelvétel).
2. Megvizsgáljuk a hatóanyagok hatását a brojlercsirke immunológiai paramétereire, génexpressziós vizsgálatok keretében az alábbi citokinek és receptorok esetén: *IL-1 $\beta$* , *IL-6*, *IFN- $\alpha$* , *IFN- $\gamma$* , *TLR-4*, *TLR-5*.
3. Meghatározzuk a növényi kivonatok hatását a brojlercsirke citokinekre (*IL-1 $\beta$* , *IL-6*) fehérjeszinten, valamint a vérplazma IgG szintjére.
4. Elvégezzük a hatóanyagok hatásának vizsgálatát a brojlerlek béltraktusának mikrobiotáját alkotó baktériumcsoportok esetén: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Salmonella*, *Escherichia coli*.
5. Meghatározzuk a hatóanyagok táplálóanyag-felszívódásra gyakorolt hatását a következő intesztinális morfológiai paraméterek által: villushossz, kriptamélység, villushossz és a kriptamélység aránya, teljes bélnyálkahártyaréteg-vastagság.
6. A már ismertetett hatóanyagoknak a brojlercsirke viselkedésére gyakorolt hatását is megvizsgáljuk.

### **Ponttyal végzett vizsgálatok:**

1. A növényi hatóanyagok lehetséges immunmoduláns hatását a pontynál is megvizsgáljuk az alábbi citokinekénél, mRNS szinten: *IL-1 $\beta$* , *IL-8*, *TNF- $\alpha$* , *IRF-1*.
2. Megvizsgáljuk a hatóanyagok ponty-béltraktus morfológiájára gyakorolt hatását is a villushossz, villusszélesség, bélfal izomréteg-vastagság esetén.

## 2. Anyag és módszer

### 2.1 A növényi kivonatok előállítása

#### Karotinoidok

A karotinoidok kivonását magyar édes pirospaprika-őrleményből végeztük. A mintákat vízfürdőben tartottuk, majd átszűrtük és bepárlást követően HPLC pigment reagensben oldottuk. A további elválasztást HPLC készülék segítségével végeztük. Diódasoros detektálást követően a HPLC profil alapján azonosítottuk a legnagyobb területtel rendelkező karotinoid komponenseket, melyek a következők voltak: *kapszantin*, *cisz-kapszantin*,  *$\beta$ -karotin*, *zeaxantin*.

#### Arabino-galaktóz tartalmú oligoszacharidok

Magyar édes pirospaprika ipari feldolgozása során keletkező melléktermékből magas arabino-galaktóz tartalmú oligoszacharidokat vontunk ki. Az oligoszacharidok kinyerése és az oligoszacharid komponensek meghatározása HP5890 gázkromatográf segítségével történt. Lángionizációs detektálást követően az oligoszacharidokat alkotó, alábbi monomer egységeket azonosítottuk: *gliükóz*, *arabinóz*, *xilóz*, *galaktóz*, *mannóz*.

#### Antocianinok

Az antocianinok kivonása magyar meggyből történt. A meggy kimagozását követően a mintát homogenizáltuk, majd a kinyeréshez metanol:víz:ecetsav = 25:24:1 arányú oldatot használtuk. A minták keverését, szűrését, centrifugálását követően azokat frakcionáltuk és vákuumban szárítottuk. VWR-Hitachi ChromasterUltraRs UHPLC berendezés segítségével meghatároztuk a kivonat antocianin profilját. Az antocianin komponensek mennyiségének meghatározására UV-VIS detektálást követően került sor (NEMES és mtsai, 2018). Az alábbi, fő antocianin komponenseket azonosítottuk: a *cyanidin-3-O-glucosyl-rutinoside*, *cyanidin-3-O-rutinoside*, *cyanidin-3-O-monoglucoside* (HOMOKI és mtsai, 2016).

## 2.2 Brojlercsirkével végzett vizsgálatok

### 2.2.1 A kísérleti beállítás és mintavétel

A kísérlet beállítása Ross 308 genotípusú brojlercsirkékkel történt. A kísérletben összesen 900 egyed vett részt, melyek egynapos korukban érkeztek és brojlertápot kaptak. A kísérlet ideje 42 napig tartott. A kontrollcsoporton kívül kialakításra került egy pozitív kontrollcsoport is, melynél a hízótáphoz 0,05%-ban adtuk a  $\beta$ -glükánt. A kontroll, a pozitív kontrollcsoportokon kívül 3 további kezelés került beállításra, melyeknél takarmánykiegészítőként a karotinoidokat, a magas arabino-galaktóz tartalmú oligoszacharidokat és az antocianinokat alkalmaztuk, kezelésenként 0,5%-ban.

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 ( $n = 18/\text{kezelés}$ ). Az átlagos napi takarmányfelvételt volierenként ( $n = 3$ ) határoztuk meg.

Az immunválasz indukálása érdekében a kísérlet 26. napján kezelésenként 6 egyedet 2 mg/tkg *Escherichia coli* O55:B5 baktérium sejtfalából származó lipopoliszachariddal (LPS) immunizáltunk. A kontrollcsoporton belül további 6 egyedet fiziológiás sóoldattal is beoltottunk annak érdekében, hogy szimuláljuk a tűszúrás által kiváltott stresszhatást ( $n = 6/\text{kezelés}$ ; 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 teljes lép tömegének mérését követően az összes mintát  $-196^{\circ}\text{C}$ -os folyékony nitrogénbe helyeztük, ezt követően a további felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A mintagyűjtés során további, körülbelül 1 cm-es ileummintákat gyűjtöttünk a csípőbél hátsó szakaszából ( $n=3/\text{kezelés}$ ) és 10 %-os formalinban, szobahőmérsékleten tároltuk morfológiai paraméterek meghatározásának céljából (SALIM és mtsai, 2013). A mikrobiota meghatározásához bélsármintákat gyűjtöttünk a kísérlet 19. napján.

### 2.2.2 RNS izolálás és cDNS szintézis

A teljes RNS izolálás során Direct-zol™ RNS MiniPrep Kit-et alkalmaztunk. A lép és az ileumminták kimérését követően a mintákhoz TRI Reagenst adtunk, majd munkánk során a kit által javasolt protokoll alapján jártunk el. Az RNS izolálás során DNáz kezelést is

alkalmaztunk. Az RNS tisztaságát és koncentrációját NanoDrop ND-1000 spektrofotométer segítségével határoztuk meg. Az RNS integritást 1%-os agaróz gélelektroforézis segítségével ellenőriztük.

Az RNS átírása cDNS-sé reverz transzkriptáz segítségével történt, melyhez a qPCRBIO cDNA Synthesis Kit-et alkalmaztuk. A reakciók 800 ng RNS-t, 4 µl 5x cDNS szintézis mixet random hexamerekkel és oligo d(T)-vel, valamint 1 µl 20x MMLV típusú reverz transzkriptázt tartalmaztak. A reakció 40°C-on 30 percig, majd a reverz transzkriptáz denaturációja 85°C-on 10 percig tartott. Az így kapott cDNS-t tízszeresére hígítottuk, majd -20°C-on tároltuk.

### 2.2.3 Kvantitatív PCR (qPCR)

A referenciagén kiválasztásánál a lépnél a *GAPDH*, az ileumnál az *ACTB* bizonyult a legstabilabban kifejeződő referenciagénnek. A vizsgált gének meghatározásához intron átívelő, forward és reverse primereket terveztünk. A qPCR-hez 384 lyukú plate-t alkalmaztunk, a reakcióelegyeket 3 technikai ismétlésben vittük fel a plate-re. A reakciók a következőket tartalmazták: 1 µl (4 ng) cDNS, 5 µl 2x SG Xceed qPCR Hi-ROX mix, 0,2 µl 200 nM primerenként, 3,6 µl desztillált víz. A mérések során Light Cycler 480 Instrument II típusú készülékkel dolgoztunk. A qPCR a következő folyamatokból állt: denaturáció 95°C-on 2 percig, majd 40 cikluson keresztül denaturáció 95°C-on 5 mp-ig és primerek tapadása/lánchosszabbítás 60°C-on 30 mp-ig. Az eredmények meghatározásához a Pfaffl módszert alkalmaztuk (PFAFFL, 2001), a vizsgált gén expresszióját a referenciagén expressziójához történő normalizálása által. Az alkalmazott módszer képletét a következő egyenlet írja le:

$$R = [(E_{\text{Célgén}})^{\Delta Ct \text{ Cél gén (Kontroll-Minta)}}] / [(E_{\text{Referenciagén}})^{\Delta Ct \text{ Referencia gén (Kontroll-Minta)}}]$$

ahol:

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

#### 2.2.4 ELISA módszer

Az IL-1 $\beta$ , az IL-6 citokinek és az IgG antitest mérését vérplazmából végeztük, QnD Chicken ELISA Kit segítségével. A Kit-ek a dupla-szendvics ELISA technikát követték, a munkánk során a kit által javasolt protokollt alkalmaztuk. Az egyes mintákhoz tartozó koncentrációkat a HTX Synergy Multi-Mode mikroplate olvasóval, a Gen5 3.03 szoftver segítségével számoltuk ki, ahol a standard sor koncentrációi alapján a mintákhoz tartozó, 450 nm-en mért abszorbancia értékeket lineáris standard kalibrációs görbére vetítettük, melynek x tengelye a koncentrációkat, y tengelye az abszorbancia értékeket tartalmazta.

#### 2.2.5 Bakteriális DNS izolálás és Polimeráz Lánreakció (PCR)

A béltraktus mikrobiota vizsgálatához bélsármintákból izoláltunk DNS-t. A bakteriális DNS izoláláshoz az E.Z.N.A.<sup>®</sup> Stool DNA Kit-et alkalmaztuk és a kit által biztosított protokollt követtük. A DNS koncentrációjának meghatározása a 2.2.2 pontban leírtakkal megegyezően történt. A DNS-t a további felhasználásig -20°C-on tároltuk.

PCR technika segítségével a *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Campylobacter*, *Clostridium*, *Salmonella* és *Escherichia coli* baktériumcsoportok 16S rDNS szakaszára tervezett specifikus primerpárokkal amplifikáltuk a bakteriális DNS-t. Alkalmaztunk továbbá egy univerzális baktérium primerpárt is, ami a teljes mikrobiota populáció meghatározására szolgált és az egyes baktériumcsoportokat ehhez hasonlítottuk. A PCR reakciók végtérfogata 20  $\mu$ l volt, melyek a következőket tartalmazták: 2  $\mu$ l (10 ng) DNS templát; 0,1  $\mu$ l (0,5 U) DreamTaq polimeráz; 0,2  $\mu$ l 200 nM primerenként; 2  $\mu$ l 10x DreamTaq Zöld Puffer; 0,4  $\mu$ l 10 nM dNTP; 1,6  $\mu$ l 25 nM MgCl<sub>2</sub>; 13,5  $\mu$ l desztillált víz. A PCR a következő kondíciókból állt: polimeráz aktiváció 95°C-on 5 percig, majd 35 cikluson keresztül denaturáció 95°C-on 30 mp-ig, anelláció 60°C-on 30 mp-ig és 72°C-on 1 percig, majd utolsó lépésként 1 cikluson keresztül elongáció 72°C-on 5 percig.

#### 2.2.6 Intesztinális morfológiai vizsgálat

A csípőbélmintákból (n=3/kezelés) a következő paraméterek kerültek meghatározásra: villus (bélboholy) hossz, kriptomélység, villushossz:kriptomélység, teljes *mucosa* (bélnyálkahártyaréteg) vastagság. Az ileummintákból metszeteket vettünk ki, majd a metszetek hematoxilin-eozin festését követően azokról fotókat készítettünk mikroszkóphoz



kapcsolt kamera segítségével (FISCHER és mtsai, 2008). A felsorolt paraméterek méréséhez az Adobe Photoshop CC version 19.1.6 szoftvert alkalmaztuk.

### **2.2.7 Viselkedés-megfigyelés**

A madarak viselkedésének megfigyelését a kísérlet 25., valamint a 32. napján, délelőtti (9:00-10:00) és délutáni (14:00-15:00) napszakokban is elvégeztük. A madarak tevékenységei során a takarmánycsipegetést, az ivóvízfogyasztást, a pihenést, a járkálást és a szárnynyújtogatást figyeltük, mely cselekvésekből a madarak komfortérzetére lehet következtetni. Az eredmények az adott tevékenységek gyakoriságában (%) kerültek meghatározásra.

## **2.3 Ponttyal végzett vizsgálatok**

### **2.3.1 A kísérleti beállítás és mintavétel**

A kísérlet beállítása összesen 132 egynyaras ponttyal történt, a nevelésük intenzív recirkulációs rendszerben zajlott. 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) és kialakításra került 3 kísérleti csoport is, melyek a már korábban ismertetett bioaktív növényi hatóanyagokat (karotinoidok, oligoszacharidok, antocianinok) 1%-ban tartalmazták. A kontrollcsoport és a kezelések 3 ismétlésben kerültek beállításra, medencenként 11 egyeddel. A mintavétel ideje a kísérlet 6. hetén történt, mely során a teljes lép és a középbél középső szakaszáról származó szövetmintákat gyűjtöttünk. A mintákat a felhasználásig  $-80^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk. A középbél középső szakaszáról további, 1 cm-es mintát gyűjtöttünk, melyet PBS oldattal tisztítottunk, majd 10%-os formalinban tároltunk morfológiai paraméterek mérésének céljából.

### **2.3.2 RNS izolálás és cDNS szintézis**

A teljes RNS izolálás a 2.2.2 pontban meghatározottakkal azonosan történt. A cDNS szintézishez a Maxima H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit-et alkalmaztuk. A reakciók a következő komponenseket tartalmazták: 400 ng RNS, 1  $\mu\text{l}$  oligo d(T) primerek,

2  $\mu$ l dNTP, 1  $\mu$ l reverz transzkriptáz enzim, 4  $\mu$ l 5X reverz transzkripció puffer, 1  $\mu$ l RNáz gátló, nukleáz-mentes víz. A cDNS szintézis körülményei a következők voltak: inkubáció 65°C-on 30 percig, termináció 85°C-on 5 percig.

### 2.3.3 Kvantitatív PCR

A génexpressziós vizsgálatok elvégzése a 2.2.3 pontban leírtakhoz hasonlóan történt, az alábbi eltérésekkel: A ponty esetén a lépnél a *40S* riboszómális fehérje génje, a középbélnél a *GAPDH* bizonyult a legstabilabban kifejeződő referenciagénnek. A reakciók a következőket tartalmazták: 2  $\mu$ l (4 ng) cDNS, 2  $\mu$ l 5x HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix, 0,2  $\mu$ l 200 nM primerenként, 5,6  $\mu$ l desztillált víz. A qPCR a következő folyamatokból állt: enzim aktiváció: 95°C-on 12 percig, majd 40 cikluson keresztül: denaturáció 95°C-on 15 mp-ig, anelláció: 60°C-on 20 mp-ig, elongáció: 72°C-on 20 mp-ig.

### 2.3.4 Intesztinális morfológiai vizsgálat

A formalinban tárolt középbélmintákból ( $n = 3$ /kezelés) metszeteket vágunk, majd a metszetek hematoxin-eozin festését követően azokról mikroszkópi fotókat készítettünk. A méréshez a cellSens Entry szoftvert alkalmaztuk, melynél az alábbi paramétereket vizsgáltuk: villushossz, villusszélesség és a bélfal izomrétegének vastagsága.

## 2.4 Statisztikai analízis

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

### 3. Eredmények

#### 3.1 Brojlercsirkével végzett vizsgálatok eredményei

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

A kezelések nem gyakoroltak hatást az élősúlyra. 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 (1. táblázat).

1. táblázat

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

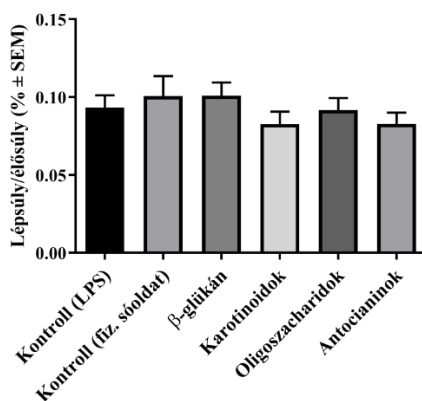
Termelési paraméter	Kezelés					RMSE*
	Kont.	$\beta$ -gl.	Karot.	Oligosz.	Antoc.	
Átlagos élősúly (g/madár) 42. nap	2758	2727	2748	2618	2590	98
Átlagos napi súlygyarapodás (g/nap/madár) 1-42. nap	65	64	65	61	61	2
Átlagos napi takarmányfelvétel (g/nap/madár) 1-42. nap	73 <sup>a</sup>	83 <sup>b</sup>	81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

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

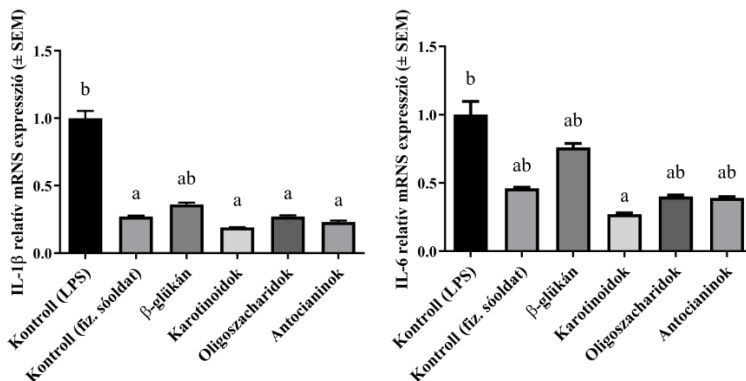
A brojlercsirkek lépsúlyának élősúlyhoz viszonyított arányai az 1. ábrán láthatók. Az alkalmazott növényi hatóanyagok nem befolyásolták a brojlercsirkek lépének súlyát. Hasonló eredményeket figyeltek meg SHANG és mtsai (2015) és a brojlercsirkek egészséges immunstátuszáról számoltak be, ugyanis a lép, mint immunszerv relatív tömege nem változott 21 napos korban, amikor kísérlet során frukto-oligoszacharidokat alkalmaztak takarmánykiegészítőként és *Salmonella enteritidis* sejtfalából származó LPS-sel immunizálták a csirkéket.



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

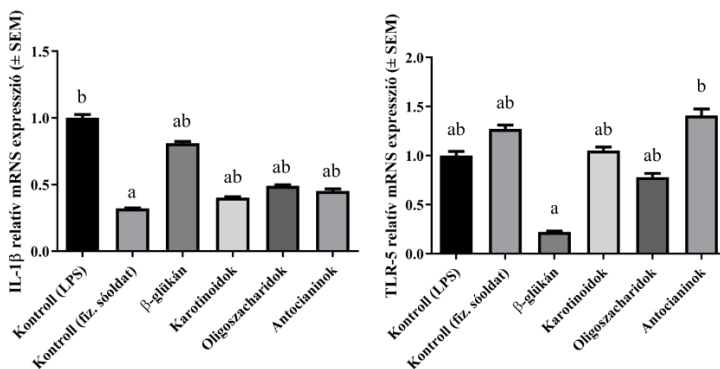
A brojlercsirke lépében mért citokinek (*IL-1β*, *IL-6*) mRNS expressziója a 2. ábrán jelenik meg. A β-glükánnal történő takarmánykiegészítés nem jelentett hatást a vizsgált gének expressziójára. A karotinoidos kezelés több mint 80%-kal alacsonyabb ( $p = 0,0114$ ) *IL-1β* génexpressziót eredményezett a lépben az LPS-sel immunizált kontroll csoporthoz képest. A karotinoidok csökkentették ( $p = 0,0325$ ) az *IL-6* génexpresszióját a lépben az LPS-sel injektált kontrollcsoporthoz mérten és az említett citokin több mint 70%-kal alacsonyabb mRNS szintjét eredményezték. Az *IL-1β* génexpressziója a lépben körülbelül 70%-kal

csökkent ( $p = 0,0497$ ) az oligoszacharidos kezelés hatására is, ám a további gének kifejeződésére a kezelés nem gyakorolt hatást. Az antocianinok majdcsak 80%-kal csökkentették az *IL-1 $\beta$*  ( $p = 0,0303$ ) mRNS szintjét.



a, b =  $p < 0,05$

2. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlerszirke citokinjeinek relatív génexpressziójára a lépben



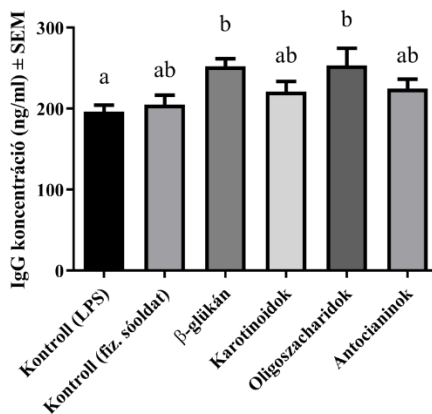
a, b =  $p < 0,05$

3. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlerszirke 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  $\beta$ -glükános csoportnál alacsonyabb *TLR-5* génexpressziót ( $p = 0,0387$ ) mértünk az antocianinos kezeléshez képest és a *TLR-5* mRNA szintje 22%-ra csökkent. 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.

A génexpressziós vizsgálatok során egyetlen esetben tapasztaltunk változást a  $\beta$ -glükános takarmánykiegészítés hatására, amikor a kezelés csökkentette az ileális *TLR-5* mRNA expressziót az antocianinos kezeléshez képest. SHEORAN és mtsai (2017) a csökkent *TLR-5* génexpressziós szintet a patogének csökkenő kolonizációjával hozták összefüggésbe. 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 $\beta$*  mRNA szintje az LPS-immunizált madaraknál, a fiziológias sóoldattal injektált kontroll egyedekhez képest. Következésképpen elmondható, hogy a kísérlet során alkalmazott *Escherichia coli* sejtfalából 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. 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* mRNA szintje a lépben. Ezen eredmények alapján megállapítható, hogy a karotinoidok képesek lehetnek a gyulladással paraméterek csökkentésére, ezáltal a gyulladás mértékének mérséklése szempontjából hasznos takarmánykiegészítőnek bizonyulhatnak. 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 gyulladással fokának enyhítésében.

A takarmánykiegészítőként alkalmazott antocianinoknak a madár immunválaszra kifejtett hatását is megfigyeltük, mely során megállapítottuk, hogy az antocianinok csökkentették az *IL-1 $\beta$*  mRNS mennyiségét a lépben. CHANGXING és mtsai (2018) szintén az antocianinok hatását tanulmányozták és meghatározták, hogy antocianin-kiegészítés csökkenti a ciclooxigenáz-1 (COX-1) és ciclooxigenáz-2 (COX-2) gyulladásoz enzimiek szintjét, ezáltal gátolja a proinflammatorikus interleukinek expresszióját.



a, b =  $p < 0,05$

#### 4. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a brojlercsirke IgG koncentrációjára a vérplazmában

A 4. ábrán látható a humorális immunválaszban résztvevő IgG antitest koncentrációja. A brojlercsirke vérplazma IgG szintje nőtt a  $\beta$ -glükán (pozitív kontroll) csoport esetén ( $p = 0,0382$ ), valamint az oligoszacharidos kezelés ( $p = 0,0449$ ) hatására, míg a további kezelések nem gyakoroltak hatást a vérplazma IgG szintjére. CAI és mtsai (2012) kísérletében a takarmánykiegészítés hatására ugyancsak növekedett az IgG szintje brojlereknél, amit a szerzők a csirkék humorális immunválaszának fejlődésével magyaráztak. A plazma IgG szintje szintén növekedett 21 napos csirkéknél is, melyek 2 mg/kg xylo-oligoszachariddal kiegészített hízótápot kaptak. A szerzők ezt a xylo-oligoszacharidok immunfunkciót javító hatásával indokolták (YUAN és mtsai, 2018).

### 3.1.2 A bioaktív hatóanyagok hatása a brojlercsirke intesztinális morfológiájára

A hosszabb villusok (bélbolyhok) és rövidebb kriptamélységek nagyobb felületet biztosítanak az emésztési folyamatoknak, ezáltal a táplálóanyagok felszívódásának (MUNYAKA és mtsai, 2012). A villusok hosszának és a kripta mélységeinek nagyobb aránya ugyancsak a hatékonyabb táplálóanyag-felszívódást szolgálja (SONG és mtsai, 2019). Morfológiai vizsgálataink (2. táblázat) 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 az említett paraméterre. 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 magasabb értékeket, vastagabb bélnyálkahártya-réteget 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 tápanyagok 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 csirkékénél. XU és mtsai (2003) 0,4%-os frukto-oligoszacharidos kiegészítés hatására ugyancsak hosszabb villusokat és nagyobb villushossz:kriptamélység arányt határoztak meg a csirkék ileumában. SHANMUGASUNDARAM és mtsai (2013) nagyobb villushossz:kriptamélység arányról számoltak be csirkékénél, élesztősejtfallal kiegészített takarmányozás hatására.



A brojlécsirke intesztinális morfológiai paramétereinek eredményei a bioaktív növényi hatóanyagok hatására

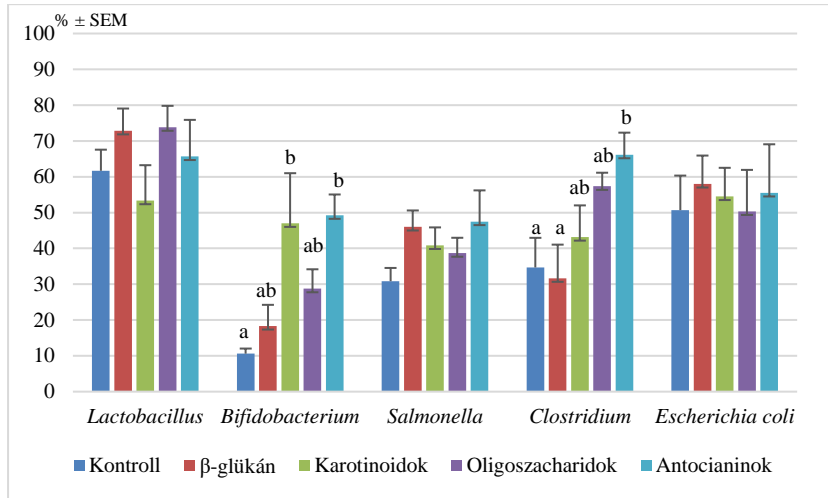
Morfológiai paraméter	Kezelés						<i>p</i> -érték
	Kontroll (LPS)	Kontroll (fiz.só)	β-glükán	Karotinoidok	Oligoszacharidok	Antocianinok	
Villushossz (μm)	774,31±20,3 <sup>a</sup>	712,02±13,1 <sup>a</sup>	998,93±11,9 <sup>b</sup>	908,94±11,8 <sup>b</sup>	977,08±24,1 <sup>b</sup>	921,84±17,8 <sup>b</sup>	<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.

### 3.1.3 A bioaktív hatóanyagok hatása a brojlércsirke bél-mikrobiota összetételére

A brojlércsirke bélsármintáiból meghatározott *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Salmonella*, *Campylobacter* és *Escherichia coli* baktériumcsoportok PCR termékeinek relatív aránya a teljes vizsgált baktériumszámhoz képest a kontrollcsoport és a bioaktív növényi hatóanyagokkal beállított kezelések esetén az 5. ábrán olvashatók.

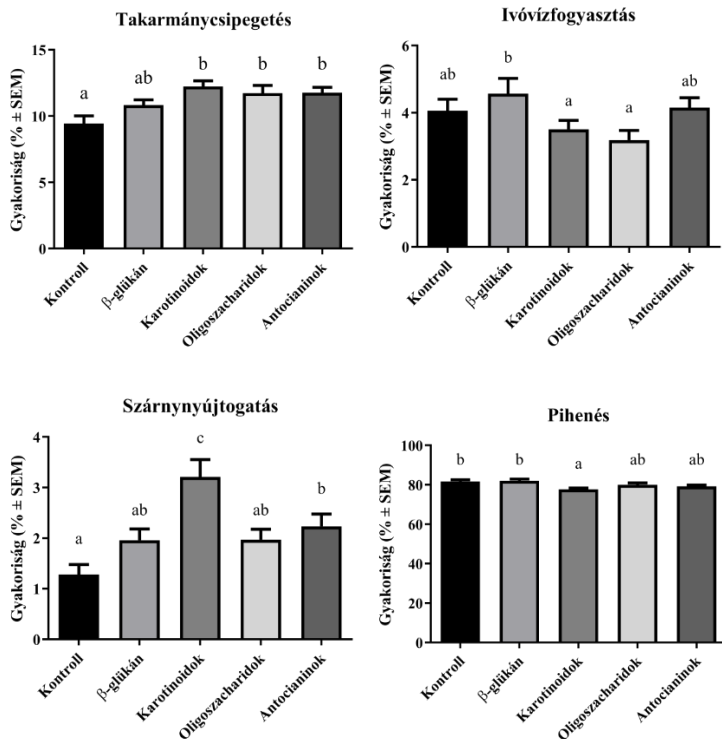


a, b =  $p < 0,05$

5. ábra: A brojlércsirke bélsármintáiból meghatározott baktériumcsoportok PCR termékeinek relatív aránya

A bioaktív növényi hatóanyagok közül a karotinoidok és az antocianinok hatására növekedett a *Bifidobacteriumok* relatív aránya a kontrollcsoportéhoz viszonyítva. A *Bifidobacteriumok* a mikrobiota hasznos baktériumai, melyek stimulálják más hasznos mikrobák növekedését, élettevékenységeit (LUCCHINI és mtsai, 1998; MIKKELSEN és mtsai, 2003), ezáltal a karotinoidok és az antocianinok pozitív hatással lehetnek a *Bifidobacterium* nemzetség növekedésére a csirkék béltraktusában. A kontroll valamint a  $\beta$ -glükán (pozitív kontroll) csoportokhoz képest az antocianinos kezelés hatására emelkedett a *Clostridium* nemzetség relatív aránya is. A *Clostridiumok* szinte mindenhol megtalálhatók a környezetben, valamint a humán és az állati béltraktus mikrobiotájának jellemző alkotói (BRANDT és mtsai, 1999).

### 3.1.4 A bioaktív hatóanyagok hatása a brojlercsirke viselkedésére



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

6. ábra: A brojlercsirke viselkedés-megfigyelésének eredményei

A takarmánycsipegetés gyakoriságát (6. ábra) a karotinoidos ( $p < 0,0001$ ), az oligoszacharidos ( $p = 0,0012$ ) és az antocianinos ( $p = 0,0011$ ) kezelés egyaránt növelte. Az ivóvízfogyasztást a karotinoidos ( $p = 0,0437$ ) és az oligoszacharidos ( $p = 0,027$ ) takarmánykiegészítés esetén figyeltük meg a legkevesebbszer a β-glükán csoporthoz mérten. A komfortérzetet jelző szárnynyújtogatás a karotinoidos takarmánykiegészítés esetén fordult elő a legnagyobb arányban. A kezelést az antocianinos takarmánykiegészítés követte ( $p = 0,0387$ ), ahol a megfigyelt madaraknak 2,2%-a nyújtózkodott. A legtöbb pihenő madarat a kontrollcsoport

(81,65%) és a  $\beta$ -glükános kezelés (82,06%) esetén, míg a kontrollcsoporthoz képest a legkevesebb ( $p = 0,0018$ ) pihenő madarat a karotinoidos kezelésnél (77,71%) számoltuk. A brojlereknek körülbelül 3,1-3,8%-a járkált a megfigyelések során. A járkálás gyakoriságát egyik hatóanyag sem befolyásolta.

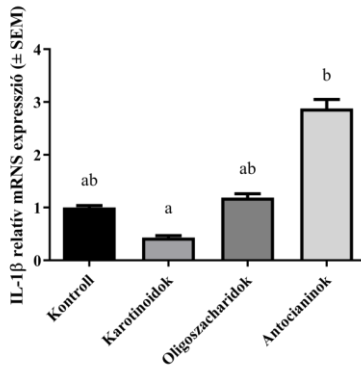
SYMEON és mtsai (2010) kísérletükben a csirkék takarmányához oregánóolajat adtak 100 és 250 mg/kg koncentrációban. A megfigyeléseik során mindkét koncentráció hatására csökkent az etetővályúk és az itatók felkeresése, valamint a mozgás tevékenységének gyakorisága. Mindezt a szerzők az illóolaj nemkívánatos ízével/illatával indokolták, továbbá azzal, hogy a madaraknál az evés és ivás gyakorisága között egyenes arányosság áll fenn.

EL IRAQI és FAYED (2012) kísérletében a komfortérzetet mutató tevékenységek közül a tollászkodás az inaktívált 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 inaktívált élesztőt tartalmazó termék stimulálja a brojlerek immunitását és minimalizálja a stresszhatást.

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 és az antocianinok hatására gyakoribb volt, ami összefüggésben lehet az említett hatóanyagok 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.

### 3.2 A ponttyal végzett vizsgálatok eredményei

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



a, b:  $p < 0,05$

7. ábra: A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a ponty *IL-1β* relatív génexpressziójára a középbelben

A takarmányban 1%-ban alkalmazott karotinoidok, oligoszacharidok és antocianinok hatását a ponty citokinjeinek génexpressziós szintjeire nézve ugyancsak meghatároztuk. A karotinoidok alkalmazását követően a vizsgált *IL-1β*, *IL-8*, *TNF-α* és *IRF-1* génexpressziós szintjeire az említett növényi kivonat nem volt hatással a kontrollcsoporthoz képest. A karotinoidos etetés hatására a gyulladáskeltő *IL-1β* génexpressziós szintje csökkent az antocianinos kezeléshez mérten (7. ábra).

LI és mtsai (2019) ugyancsak az *IL-1β* és a *TNF-α* proinflammatorikus citokinek csökkenő génexpressziós szintjéről számoltak be. Tanulmányukban az északi kígyófej (*Channa argus*) etetésénél a karotinoidokhoz sorolható asztaxantint alkalmazták 50, 100 és 200 mg/ttkg-os koncentrációban, valamint a kísérlet során a halaknál LPS-indukálást alkalmaztak. Mivel az asztaxantin gátolta a gyulladásozó citokinek kifejeződését, a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a karotinoid komponens képes csökkenteni a gyulladásozó immunválaszt.

A kísérlet során alkalmazott oligoszacharidok és antocianinok nem befolyásolták a vizsgált citokinek génexpressziós szintjét. 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 *IL-1 $\beta$*  mRNS szintjében sem, valamint a 2%-os kiegészítés következményeként a *TNF- $\alpha$*  mRNS szintjében sem. Ezzel ellentétben, a 0,5%-os galakto-oligoszacharid-kiegészítés szignifikánsan csökkentte 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. Következtetesképpen, 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).

Eredményeinkkel ellentétben, az *IL-1 $\beta$*  és *TNF- $\alpha$*  szintje nőtt a lépben a 7,5 g/kg-os szeder szirupos kiegészítés hatására, ezáltal a szerzők arra a következtetésre jutottak, hogy a szeder szirup fokozza a veleszületett immunrendszer alkotóinak termelődését és az immunrendszer fejlődését (YILMAZ, 2019).

### **3.2.2 A bioaktív növényi hatóanyagok hatása a ponty intesztinális morfológiájára**

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

A villusok hosszát tekintve (3. táblázat) 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				p-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>	p < 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>	p < 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>	p = 0,0048

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

Az eredmények átlag ± SEM értékekben jelennek meg.

Az eredményeinkhez hasonlóan a villusok hossza ugyancsak változatlan maradt mind az elülső-, mind a közép- és mind az utóbél szakaszokban is vörös árnyékhalnál (*Sciaenops ocellatus*), amikor takarmánykiegészítőként frukto-oligoszacharidokat, galakto-oligoszacharidokat, mannán-oligoszacharidokat, vagy galakto-glükó-mannánokat alkalmaztak a takarmányban 10g/kg-ban, 8 héten keresztül (ZHOU és mtsai, 2010). Eredményeinkkel ellentétben, a 12,5 valamint a 25 mg/kg-ban flavonoidokat tartalmazó grapefruit kivonattal kiegészített takarmány hatására magasabb és szélesebb villusokat mértek a gyöngyös koncér (*Rutilus frisii kutum*) elülső bélszakaszában (SAMAVAT és mtsai, 2019). YUJI-SADO és mtsai (2015) azonban hosszabb villusokat mértek 0,2- és 0,4% mannán-oligoszacharid kiegészítés hatására a nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) elülső béltraktusában a kísérlet 30. napján. A tilápia bélfal izomrétegének vastagsága is nőtt a 0,4%-os mannán-oligoszacharid kiegészítés hatására. Következtetésként elmondható, hogy a táplálóanyag-felszívódás a kontrollcsoport esetén lehet a leghatékonyabb, míg az emészthetőség szempontjából az antocianinos kezeléssel hátrányt jelenthetnek a kisebb és keskenyebb villusok, valamint a kisebb bélfal izomréteg-vastagság.

#### 4. Az értekezés új tudományos eredményei

A karotinoidoknak, az oligoszacharidoknak és az antocianinoknak a brojlercsirke immunológiai és intesztinális morfológiai paramétereire, a bél-mikrobiótára, 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  $\beta$ -glükánkiegészítés (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 gyulladásoz 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 $\beta$*  géneexpressziós 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 pontybél morfológiai paramétereire kifejtett kedvező hatását sem sikerült kimutatni.

## 5. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

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 *karotinoidok* 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 bélmorfometriai 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.

## 6. Irodalomjegyzék (felhasznált irodalom)

1. 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.
2. 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.
3. BRANDT, L. – KOSCHE, K. – GREENWALD, D. – BERKMAN, D. (1999): Clostridium Difficile-Associated Diarrhea in The Elderly. The American Journal of Gastroenterology. 94, 3263-3266.
4. 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.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. FISCHER, A.H. – JACOBSON, K.A. – ROSE, J. – ZELLER, R. (2008): Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. CSH Protocols.
10. 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.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. MIKKELSEN, L. – BENDIXEN, C. – JAKOBSEN, M. - JENSEN, B. (2003): Enumeration of *Bifidobacteria* in Gastrointestinal Samples from Piglets. *Applied and Environmental Microbiology*. 69, 654-658.
17. 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.
18. 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.
19. PAN, D. – YU, Z. (2014): Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*. 5, 108-119.
20. PFAFFL, M.W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29, 2002–2007.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.

25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. VARGA, J. – TUBOLY, S. – MÉSZÁROS, J. (2007): *Háziállatok fertőző betegségei (Állatorvosi járványtan II.)*. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 522 p.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. YILMAZ, S. (2019): 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.
34. 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*.
35. 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.
36. 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.

## 7. Publikációs jegyzék



**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., Jávör, 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: Arcral 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*) vérbiokémiail 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 gyulladásoo folyamatokban részt vevő faktorainak génextpressziójára.  
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.





