

Szent István Egyetem
Állatorvos-tudományi Kar, Állatorvos-tudományi Doktori Iskola
Budapest

A fulvosav és a huminsav biológiai hatásának vizsgálata patkányokon

Doktori (PhD) értekezés

Készítette:

Dr. Vucskits András Valentin
intézeti állatorvos

Budapest,
- 2014 -

Szent István Egyetem,
Állatorvos-tudományi Kar,
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola
Iskolavezető: Dr. Rusvai Miklós egyetemi tanár, az MTA doktora

Témavezetők:

.....
Dr. Szabó József
egyetemi tanár, az MTA doktora

.....
Dr. Hullár István
egyetemi docens, az mg. tud. kandidátusa

Témabizottsági tagok:

Dr. Szigeti Gábor
az mg. tud. kandidátusa

Dr. Veresegyházi Tamás
egyetemi docens, az állatorvos-tudomány kandidátusa

Készült 8 példányban. Ez a ... sz. példány.

.....
Dr. Vucskits András Valentin

TARTALOM

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	5
2. ÖSSZEFOGLALÓ	7
4. BEVEZETÉS	9
5. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
5.1. Nevezéktan, fogalom-meghatározások	11
5.2. A humuszanyagok keletkezése és előfordulása a természetben	12
5.2.1. Humifikáció	14
5.2.2. Szénképződés	15
5.3. A humuszanyagok szerkezete	15
5.4. A humuszanyagok legfontosabb fizikai, kémiai és biológiai reakciói	18
5.4.1. Oldhatóság	18
5.4.2. Reakciók szerves és szervetlen molekulákkal	19
5.4.3. Biológiai aktivitás	19
5.4.4. Biostimulátor-hatás (energiatermelés a sejtekben)	19
5.4.5. Toxicitás	20
5.5. Állatorvosi vonatkozások	20
5.5.1. A humuszanyagok hatása a termelési paraméterekre	20
5.5.2. A humuszanyagok hatása az immunválasz-készségre	21
5.5.3. A humuszanyagok hatása a bélflórára	22
5.5.4. A humuszanyagok hatása az antioxidáns rendszerre és a májra	23
5.5.5. A humuszanyagok hatása a pajzsmirigy működésére	24
5.5.6. A humuszanyagok hatása az ásványianyag-transzportra	25
5.5.7. A humuszanyagok gyulladáscsökkentő hatása	25
5.5.8. A humuszanyagok hatása a véralvadásra és az oxigénszállításra	25
5.5.9. A humuszanyagok hatása a szöveti regenerációra	26
5.5.10. A humuszanyagok vírusellenes hatása	26
5.5.11. A humuszanyagok higiéniai vonatkozásai	26
6. CÉLKITŰZÉSEK	27
7. ANYAG ÉS MÓDSZER	28
7.1. Első kísérlet	28
7.2. Második kísérlet	33
8. EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS	36
8.1. A fulvosav és a huminsav hatása az immunizált állatok súlygyarapodására, takarmányfogyasztására és fajlagos takarmány-felhasználásra	36
8.1.1. Eredmények	36

8.1.2. Megbeszélés.....	42
8.2. A fulvosav és a huminsav hatása a patkányok immunválasz-készségére.....	51
8.2.1. Eredmények.....	51
8.2.2. Megbeszélés.....	55
8.3. A fulvosav és a huminsav hatása a bélflórára és egyes alkotóira (<i>in vivo</i> és <i>in vitro</i>).....	61
8.3.1. Eredmények.....	61
8.3.2. Megbeszélés.....	61
8.4. A fulvosav és a huminsav hatása a vérplazma vasredukciós képességére (FRAP) és az AST aktivitására.....	63
8.4.1. Eredmények.....	63
8.4.2. Megbeszélés.....	64
8.5. A fulvosav és a huminsav hatása a pajzsmirigy működésére.....	66
8.5.1. Eredmények.....	66
8.5.2. Megbeszélés.....	67
8.6. A fulvosav és a huminsav hatása a vastagbél tartalom, valamint egyes szervek (máj, vese, csont, szőr) Fe-, Cu-, Zn- és Mn-koncentrációjára.....	71
8.6.1. Eredmények.....	71
8.6.2. Megbeszélés.....	79
9. A kísérletek eredményeinek összefoglaló értékelése.....	94
10. Új tudományos eredmények.....	97
11. Irodalomjegyzék.....	98
12. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSE.....	112
13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	115

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AIN	American Institute of Nutrition (Amerikai Táplálkozástudományi Intézet)
AST	Aspartate aminotransferase (aszpartát-aminotranszferáz)
CD	Cluster of differentiation
CFU	Colony forming unit
Con A	Concanavalin A
CRIP	Cysteine rich intestinal protein
DMT1	Divalent metal transporter 1
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid (etilén-diamin-tetraecetsav)
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EüM	Egészségügyi Minisztérium
FA	Fulvic acid (fulvosav)
FA _D	a kísérleteimben használt Dudaritból kivont fulvosav
FRAP	Ferric reducing ability of plasma (vérplazma vasredukciós kapacitása)
FVM	Földművelésügyi és Vidékfejlesztési Minisztérium
HA	Humic acid (huminsav)
HA _D	a kísérleteimben használt Dudaritból kivont huminsav
HE	Hematoxinilin eozin
HSs	Humic substances (Humuszanyagok)
IHSS	International Humic Substance Society (Nemzetközi Humuszanyag Társaság)
IL	Interleukin
IRP	Iron regulatory protein
LD ₅₀	Letális dózis (50%)
LST	Limfocita-stimulációs teszt
MGSZH	Mezőgazdasági Szakigazgatási Hivatal
MK	Mértani közép
MTP1	Ferroportin
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-metil)-2,5-difeniltetrazolium-bromid
NRC	National Research Council (Nemzeti Kutatási Tanács)
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet)
PALS	Periarterioláris limfoid sejtzóna
PHA	Phytohaemagglutinin
PWM	Pokeweed mitogen

sza.	Száranyag
TCID ₅₀	Tissue culture infective dose (50%)
TH	T limfocita helper

2. ÖSSZEFOGLALÓ

A humuszanyagokat már az ókorban is alkalmazták a gyógyászatban. Takarmánykiegészítőként történő tudatos felhasználásuk azonban csak két-három évtizedes múltra tekint vissza. Biológiai hatásuk sokszínűsége abban rejlik, hogy – szerkezetükből adódóan – szinte minden vegyülettípussal képesek reakcióba lépni. Előnyös tulajdonságaik, hogy baktericidek, viricidek, gyulladáscsökkentők, toxinkötők, adszorptívak, antioxidánsok, immunstimulánsok, javíthatják a mikroelemek felszívódását, továbbá csökkentik a nehézfémek toxicitását.

A humuszanyagok azonban nem egységesek, hanem – az oldhatóság alapján – több frakciókra oszthatók. Két legfontosabb – biológiailag legaktívabb – alkotórészük a fulvosav (FA) és a huminsav (HA). Munkám célja volt, hogy elkülönítve vizsgáljam az FA és a HA hatását a szervezet immunválasz-készségére, az immunizált állatok takarmányfogyasztására, súlygyarapodására, fajlagos takarmány-felhasználására, a bélfóra egyensúlyi állapotára, az antioxidáns rendszer egyik jellemző mutatójára, a vasredukciós képességre (FRAP), a máj állapotára (AST aktivitás és szövetten), a pajzsmirigy működésére, valamint a vastagbél-tartalom és egyes szervek (máj, vese, csont, szőr) néhány mikroelem koncentrációjára (Fe-, Cu-, Zn és Mn).

Munkám során két kísérletet végeztem. Az elsőben azt kívántam megállapítani, hogy eltérő-e az FA és a HA hatása a fenti paraméterekre vonatkozóan, valamint, hogy megállapítható-e dózis-hatás összefüggés. Kontrollcsoport mellett Dudaritból kivont fulvosavból (FA_D) és huminsavból (HA_D) is 0,1; 0,2; 0,4 és 0,8%-os kiegészítésű csoportokat alakítottam ki. A második kísérletet – az 1. kísérlet immunológiai adatai alapján – a legkedvezőbbnek talált koncentrációval (0,4%) végeztem, hogy tanulmányozzam az FA_D és HA_D humorális és celluláris immunválaszra kifejtett hatását. Mindkét kísérletben Whistar CRL:(WI) BR törzsből származó patkányokkal dolgoztam. A kísérletek időtartama 26 nap volt, az ivóvíz és a táp is ad libitum állt rendelkezésre. Az immunizálást ovalbuminnal végeztem.

Az eredmények alapján megállapítható, hogy az FA_D-t és HA_D-t – a különböző vizsgálati paraméterekre kifejtett eltérő hatásuk miatt – nem szabad egységes anyagnak tekinteni és mindenképp célszerű külön-külön vizsgálni a hatásukat. Mindkét tesztanyag nagyon erős és tartós humorális immunstimuláns hatást mutatott, és kedvezően módosította a bélfóra egyensúlyi állapotát. Az eredmények alapján a humuszanyagokban jelenlévő FA_D tekinthető felelősnek a szakirodalomban is leírt enyhe hipotireoid hatásért. A kísérletben alkalmazott HA_D jól felszívódott a bélcsatornából, így nem tartható az a nézet, hogy a HA a humuszanyagok minden esetben nagy molekulatömeg és rosszul felszívódó frakciója.

3. SUMMARY

Humic substances (HSs) have been used in medicine since ancient times. However, their conscious usage as feed supplements has only been started some 20-30 years ago. The reason for the wide spectrum of the biological effects of HSs – due to their chemical structure – is based on the fact that they can react with almost all types of chemical compounds. The advantageous characteristics of HSs are their bactericidal, viricidal, anti-inflammatory, toxin-binding, adsorptive, antioxidant, immunostimulant, microelement absorption enhancer and their heavy metal toxicity alleviating effect.

HSs are not homogenous compounds. They can be separated, based on their solubility, into different fractions. The two most important – and biologically most active – fractions are fulvic acid (FA) and humic acid (HA). The aim of my study was to investigate the effect of FA and HA on the immune response, feed consumption, weight gain, feed conversion ratio, balance of the intestinal flora, antioxidant capacity (FRAP), liver (AST and histology), thyroid function, microelement concentration (Fe, Cu, Zn, Mn) of the large intestinal content, liver, kidney, bone and hair of immunized rats separately.

Two trials were conducted in the study: in the first trial I evaluated the effect of Dudarit derived fulvic acid (FA_D) and humic acid (HA_D) on the investigated parameters separately and the occurrence of dose related impact was also examined. Besides the control group 0.1; 0.2; 0.4 and 0.8% both of FA_D and of HA_D supplemented groups were used in the trial. In the second trial I used only those FA_D and HA_D supplement levels (0.4%) which resulted in the highest immune response in the 1st (dose related) trial. The aim of the second trial was to evaluate the effect of FA_D and HA_D on the humoral and cellular immune response. Whistar CRL:(WI) BR rats were used in both trials. The duration of the trials were 26 days. Feed and water was provided ad libitum. Ovalbumine was used for immunization.

Based on the results the following conclusions can be drawn.

HSs should not be considered homogenous, therefore the effect of FA and HA on the biological parameters should be evaluated separately. Both test substances had strong and long lasting stimulating effect on the humoral immune response, and modified the balance of gut flora in the beneficial direction. The results suggested that the FA fraction of HSs was responsible for the mild hypothyroid effect, described in the scientific literature for HSs. The HA_D used in the experiment was absorbed from the intestine. Therefore the scientific dogma about the well absorbable – low molecular weight – FA and poorly or non absorbable – large molecular weight – HA has been refuted.

4. BEVEZETÉS

Az iparszerű takarmányozásban a hozamfokozó antibiotikumok betiltása (2006) miatt új, környezetbarát, természetes hozamnövelőkre van szükség. Ilyen célból számos anyaggal kísérleteznek a kutatók (pl.: probiotikumok, prebiotikumok és szimbiotikumok, növényi alapú hozamfokozók, immunstimuláns hozamfokozók stb.). Ezen anyagok hatékonysága azonban nem közelíti meg az antibiotikumokét. Ennek megfelelően jelenleg nincs olyan készítmény, amivel teljes mértékben helyettesíteni lehetne a hozamfokozó antibiotikumok komplex hatását.

A probléma megoldása szempontjából új megközelítést jelenthetnek a humuszanyagok és azok sói a humátok, melyek mindenütt előfordulnak a természetben, nagy biológiai aktivitással rendelkeznek, és már az ókor óta használatosak a humán gyógyászatban (Haanel, 1924; Brandt, 1964; Klöcking, 1984).

A humuszanyagoknak az állatok egészsége és a hozamnövelés szempontjából előnyösnek tartott tulajdonságait a szakirodalom alapján (Islam és mtsai. 2005) a következőkben foglalhatjuk össze:

- baktericidek, viricidek, gyulladáscsökkentők, toxinkötők, adszorptívok, antioxidánsok, immunstimulánsok, javíthatják a mikroelemek felszívódását, továbbá csökkentik a nehézfémek toxicitását.

A felsoroltak bizonyítására vonatkozóan azonban csak kevés objektív vizsgálat áll rendelkezésre. A humuszanyagok nem csak pozitív módon befolyásolják a szervezet működését. Ismertek olyan élettani folyamatok melyekre negatív hatással vannak, mint például a pajzsmirigyműködés (Delange, 1988; Huang és Fung, 1991; Huang és mtsai., 1994; Herzig és mtsai., 2000).

Vannak olyan biológiai paraméterek (pl. a gazdasági mutatók) melyekkel kapcsolatban ellentmondásos eredmények találhatók a szakirodalomban. Ezek egyik oka az lehet, hogy a különböző eredetű humuszanyagok eltérő koncentrációban tartalmazznak FA-t és HA-t, valamint fémtartalmuk is más. Rendelkezésre állnak azonban olyan kémiai módszerek, amelyekkel a humuszanyagokból jól meghatározható „sztenderd” FA-, illetve HA-frakció különíthető el. Ilyen alapanyag a – hazánkban, Dudar község mellett bányászott – leonarditból előállított termék, a Dudarit.

Az előzőekben leírtak alapján egy olyan vizsgálat sorozat elvégzését tartottam indokoltnak, amelyben pontos kísérleti adatokat kaphatunk arról, hogy a humuszanyagok melyik fő alkotórészéhez (FA, vagy HA) és milyen mértékben köthető az irodalomban említett hozamfokozó hatás. Fontosnak tartottam annak megállapítását is, hogy magyarázható-e a hozamfokozó hatás a szakirodalom alapján jelentősnek ítélt biológiai paraméterekkel, illetve számolnunk kell-e az FA és a HA hozamfokozóként történő

felhasználásakor állategészségügyi szempontból negatív hatással. Mindezek szem előtt tartásával terveztem meg vizsgálataimat.

Főbb célkitűzéseim az alábbiakban foglalhatók össze.

- A humuszanyagok biológiai hatásának tanulmányozása érdekében azok két fő összetevőjének – FA és HA – az elkülönített vizsgálata.
- Az FA és a HA hatásának vizsgálata
 - az immunizált állatok takarmányfogyasztására, súlygyarapodására és fajlagos takarmány-felhasználására,
 - a szervezet immunválasz-készségére,
 - a bélflóra egyensúlyi állapotára,
 - az antioxidáns rendszerre jellemző vasredukciós képességre (FRAP),
 - a máj állapotára (AST - aszpartát aminotranszferáz és szövettan),
 - a pajzsmirigy működésére,
 - a vastagbéltartalom, valamint az egyes szervek (máj, vese, csont, szőr) mikroelem-koncentrációjára (Fe-, Cu-, Zn és Mn).

5. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

5.1. Nevezéktan, fogalom-meghatározások

A szerves anyagok humifikációjával és elszenesedésével kapcsolatban kialakult kifejezések, definíciók nem egyértelműek és ez számos félreértésre ad okot. Ezért az alábbiakban megadom a dolgozatomban használt fogalmak értelmezését.

Biomassza: valamely élettérben egy adott pillanatban jelen lévő szerves anyagok és élőlények összessége.

Humusz: az elhalt és humifikálódásnak indult, elsősorban növényi szerves anyag.

Humuszanyagok: a szerves anyagok bomlásának közbenső termékei, amelyek kémiai értelemben jól meghatározható vegyületcsoportokat képeznek.

Humátok: a humuszanyagok sói.

Fulvosav (FA): a humifikálódott növényi anyag lúgban és savban is oldódó része, melynek molekulatömege kicsi (≈ 2000 Da).

FA_D: dolgozatomban, a továbbiakban FA_D-vel jelölöm a kísérleteimben használt, Dudaritból sztenderd eljárással (Swift, 1996) előállított fulvosavat.

Huminsav (HA): a humifikálódott növényi anyagok lúgban igen, de savban nem oldódó része, a humuszanyagok részben nagy molekulatömegű (5000-150000 Da) frakciója (Perminova és mtsai., 1998; Stefanovits és mtsai., 1999; McDonald és mtsai., 2004), amelyekből alkoholos kivonással himatomelánsav, szín alapján pedig barna huminsavak és szürke huminsavak különíthetők el. Ezek aránya egy adott alapanyagból (pl. Dudarit), sztenderd eljárással készített kivonatban közel állandó.

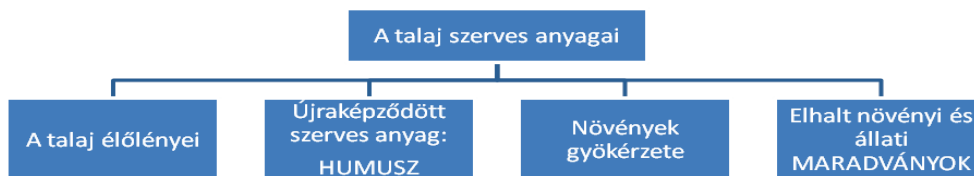
HA_D: dolgozatomban, a továbbiakban HA_D-vel jelölöm a kísérleteimben használt, Dudaritból sztenderd eljárással (Swift, 1996) előállított huminsavat.

Humin: a humuszanyagok savban és lúgban sem oldható óriásmolekulái, igen stabil, fekete színű anyag.

Humifikációs index: olyan arányszám, amely megmutatja, hogy az adott szerves anyag hányad része humifikálódott teljesen, azaz alakult át humuszanyagokká. Az egyes országokban már létező humifikációs törvény ez alapján engedélyezi a különböző szerves anyagok (komposztok, szennyvíziszapok) forgalmazását.

5.2. A humuszanyagok keletkezése és előfordulása a természetben

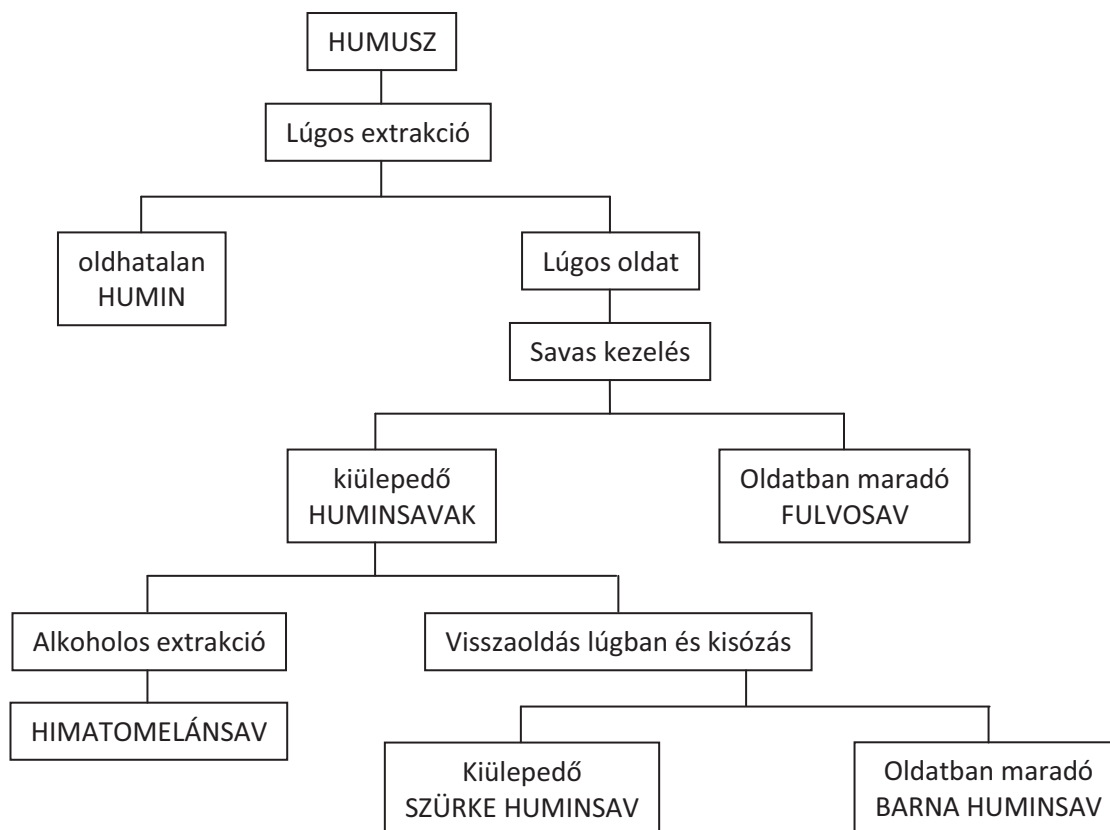
A földi élet egyik legjelentősebb sajátossága, hogy az élő anyag reprodukcióját döntően annak szilárd bomlástermékei teszik lehetővé. A humuszanyagok létrejöttének kiindulási anyagai az elhalt, fás növényi részek és az állati eredetű szerves anyagok, amelyek fizikai, kémiai, enzimatis, valamint mikrobiológiai folyamatok során keletkező egyszerűbb, kis molekulatömegű anyagok kondenzációjával jönnek létre a talajban, a természetes vizekben és a fenéküledékben (Galambos, 2006). A Földön található szerves anyag (biomassza) legnagyobb részét a humuszanyagok képezik. A humusz (talajban, tőzegben stb.) a szárazföldi élet szilárd bomlásterméke, a kontinentális biomassza legfontosabb alkotója (1. ábra).



1. ábra. A talaj szerves anyagai (Kátai és mtsai., 2008)

A talajban található szerves anyagokat az alábbiak szerint csoportosíthatjuk.

- Nem valódi humuszanyagok:
 - fehérjék (peptidek, aminosavak),
 - szénhidrátok (keményítő, cellulóz, hemicellulóz, kitin, oldható cukor, aminocukrok),
 - szerves savak, (hangyasav, ecetsav, csersavak stb.),
 - lignin (a legnehezebben bontható összetevő, különböző fenilszármazékok polimerje),
 - zsírok, viaszok, gyanták.
- Valódi humuszanyagok: savas karakterű polimerek, amelyek az alábbi egymástól eltérő viselkedésű frakciókból állnak.
 - Fulvosav,
 - huminsavak:
 - himatomelánsav,
 - barna huminsavak,
 - szürke huminsavak,
 - humin.



2. ábra. A humuszanyagok felosztása és a frakciók elkülönítésének módjai (Tompa, 2000)

A humuszanyagok széles körben elterjedtek a természetben, megtalálhatóak a földben, tőzegben, kőszénben, ivóvízben stb. (Andersen és mtsai., 2005). A leggyakoribb előfordulási helyeket és azok humuszanyag-tartalmát az alábbi felsorolás foglalja össze.

Természetes vizek: a természetes vizek sárgásbarna színe nagyrészt az oldott, illetve kolloid állapotban jelenlévő humuszanyagoknak köszönhető. A gyógyiszap is részben humifikálódott tőzeg, illetve szapropél (tavak és folyók alján felhalmozódó szerves anyag). Humuszanyag-tartalma kisebb, mint 0,001%.

Talaj: közismert, folytonosan megújuló humuszforrás. A talaj felső 20-30 cm-es rétegének humuszanyag-tartalma 1-5%.

Szerves trágya: humuszanyag-tartalma 5-15%.

Szapropél: humuszanyag-tartalma 10-20%.

Tőzeg: humuszanyag-tartalma 10-40%.

Lignit: a természetes elszénesezési folyamatban a lignit humuszanyag-tartalma 10-30%. A kivételes körülmények között képződött oxidált lignit, avagy barnaszén humuszanyag-tartalma 50-80% is lehet.

A földi biomassa bomlási folyamata két fázisra különíthető el, az ún. humifikációra és a szénképződésre. A humifikáció során keletkeznek a recens (frissebb, a szénesezés folyamatában részt nem vevő) humuszanyagok, míg a szénképződés során a fosszilis

humuszanyagok. Miután a vizsgálatban használt FA-t és HA-t leonarditból, – ami a lignit felszíni rétegeiben oxidációval keletkező ásvány – azaz a szénképződés folyamatában résztvevő alapanyagból (Dudarit) állították elő, a továbbiakban ezeket – a Dudaritra utalva – FA_D-vel és HA_D-vel jelölöm.

Az alábbiakban – a humifikáció mellett – röviden kitérek a szénképződés folyamatára is.

5.2.1. Humifikáció

Definíció: a szerves anyagok átalakulásában a humifikáció a fontosabb szintetizáló reakciók összessége.

A könnyebben bontható szerves anyagok gyorsan mineralizálódnak, a nehezen bontható vegyületek polimerizálódva és N-tartalmú anyagokkal kapcsolódva, nagy molekulájú, sötétszínű, új stabil vegyületekké, humuszanyagokká alakulnak (Kátai és mtsai., 2008). A talajba jutott, elhalt növényi részek lebontásának első fázisa a mechanikai aprítás, amelyet a mezo-, makro-, és megafauna végez. A második lépésben (biokémiai fázis) kémiai folyamatok, hidrolízis és oxidáció megy végbe pl.:

- keményítő → egyszerű cukrok,
- fehérje → peptidek és aminosavak,
- lignin → kinonok, fenolok.

A második lépésben képződött vegyületek részben a talajmikrobák táplálékául, részben a humuszanyagok képződésének alapjául szolgálnak. A harmadik fázisban (enzimes lebontás) a talajbaktériumok és gombák elbontják enzimeikkel a szerves anyagot. A bomlástermékekben biotikus, illetve abiotikus (kondenzációs és polimerizációs) folyamatok eredményeként aerob, majd anaerob biokémiai oxidáció játszódik le. Ebben a stacioner egyensúlyi folyamatban képződnek a humuszanyagok alap-építőkövei, amelyek kiinduló anyagai a nehezen lebomló vegyületek (lignin, tannin, flavonoidok, glikozidok stb.) és ezek származékai. A szerves anyag többi része – fehérjék, szénhidrátok – NH₃, CO₂, H₂S, CH₄, H₂O stb. formájában távozik el a biomasszából, illetve egyes származékaik – a humuszanyagokhoz kapcsolódva – a humusz részévé válnak.

A mineralizáció és humifikáció folyamata az alábbi tényezőktől függ.

- A szerves anyagok kémiai összetétele,
- a talaj hőmérséklete (opt.: 25-40°C),
- a vízellátottság,
- levegő jelenléte:
 - aerob körülmények között a mineralizációs folyamatok kerülnek túlsúlyba,
 - anaerob körülmények között szervesanyag-felhalmozódás történik,

- a közeg pH-ja (a humifikáció folyamatában fontos baktériumok számára az 5,5-8,5 közötti pH az optimális).

5.2.2. Szénképződés

Amikor a bomló szerves anyagot, szervesetlen ásványt talajrétegek borítják be, akkor kezdődik az ásványiszén-képződés folyamata, melynek során a korábbi oxidatív környezet redukttá alakul. Mező a hőmérséklet és a nyomás. Ebben a fázisban gyakorlatilag megszűnnek a biológiai folyamatok, és a kémiai reakciók lépnek előtérbe (vízkilépés, dekarboxileződés, hidrogénelvonás). Növekszik a szerves anyag relatív széntartalma, a molekulákat összekötő aromás C-O-C kötések aromás C-C (antracén) kötéseké alakulnak.

A biomassa bomlása során a vegyületek relatív széntartalma az alábbiak szerint alakul.

- Élő fa: 50%,
- tőzeg: 55-60%,
- lignit: 65-70%,
- feketeszén: 80-90%,
- antracit: 80-98%,
- grafit: 100%.

Az ásványiszén-képződési folyamat – kivételes geológiai körülmények között – lelassulhat, vagy vissza is fordulhat azáltal, hogy levegő és víz kerül a rétegek közé, illetve a felszínre jut a réteg. Az így képződött szenet nevezik természetesen oxidált szénnek. A humuszanyag alapú termékek ipari előállítására szempontjából ez az oxidált állapotban konzerválódott szén az egyedüli gazdaságos nyersanyag. Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy a világon csak néhány ilyen lelőhely létezik. Világviszonylatban az egyik legjobb minőségű nyersanyagot (leonardit) Magyarországon bányásszák a Bakonyban, Dudar nevű település mellett (innen származik a termék neve: Dudarit).

5.3. A humuszanyagok szerkezete

Felépítésüket nem ismerjük teljesen, változatos méretű, különböző molekulákból, összetett anyagcsoportokból állnak. A humuszanyagok gyűrűs szerkezetű építőköveket tartalmazó, nagy molekulájú vegyületek. Vázukat egymáshoz kapcsolódó aromás gyűrűk alkotják, melyek közül a benzol, naftalin, hidroxikinon, kinon, furán és indol a legfontosabbak. Ezek az aromás gyűrűk közvetlenül, vagy hídkötésekkel kapcsolódnak. Hídként szereplő gyökök lehetnek:

- -O-,
- -NH-,

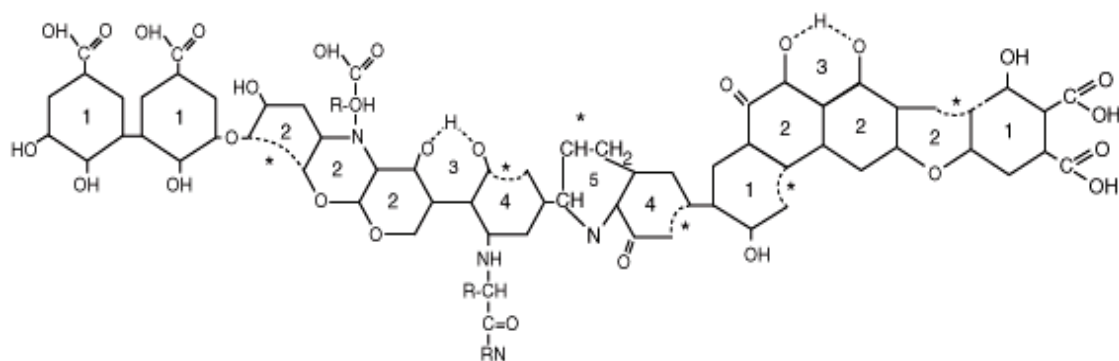
- =N-,
- =C-C=,
- -S-.

A humuszanyagok vázához különböző oldalláncok kötődhetnek, pl.: szénhidrátszerűek, peptid-, vagy aminosav-jellegűek, továbbá reaktív csoportok is lehetnek a vázon és az oldalláncokon:

- savas jellegűek
 - -COOH (karboxil),
 - -OH (fenol/alkohol),
 - =C=O (karbonil),
- bázikus jellegűek
 - =NH (imino),
 - -NH₂ (amino).

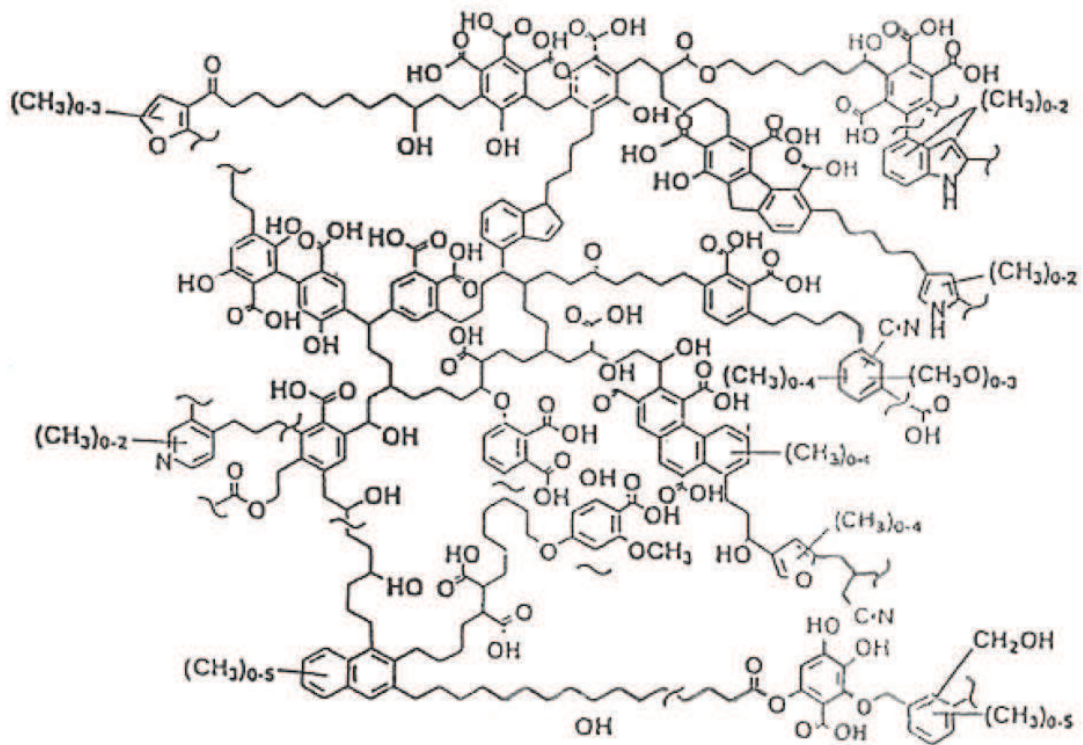
A humuszanyagok legfontosabb alkotóelemei a szén, a hidrogén, az oxigén és a nitrogén, amelyekből a szén 56-58%-ot, a nitrogén 4-6%-ot tesz ki, valamint foszfort és kén is tartalmaznak kisebb mennyiségben.

Fontos tudni, hogy a különböző biológiai környezetből származó alapanyagokból – megfelelő eljárásokkal – kémiai tisztá humuszanyagok állíthatók elő. Az így előállított humuszanyagok kémiai szerkezete meglehetősen állandó és nagyon hasonló “építőkövekből” áll (3. ábra). Mind a FA mind a HA ezen molekulák polimerizált micella alakja.



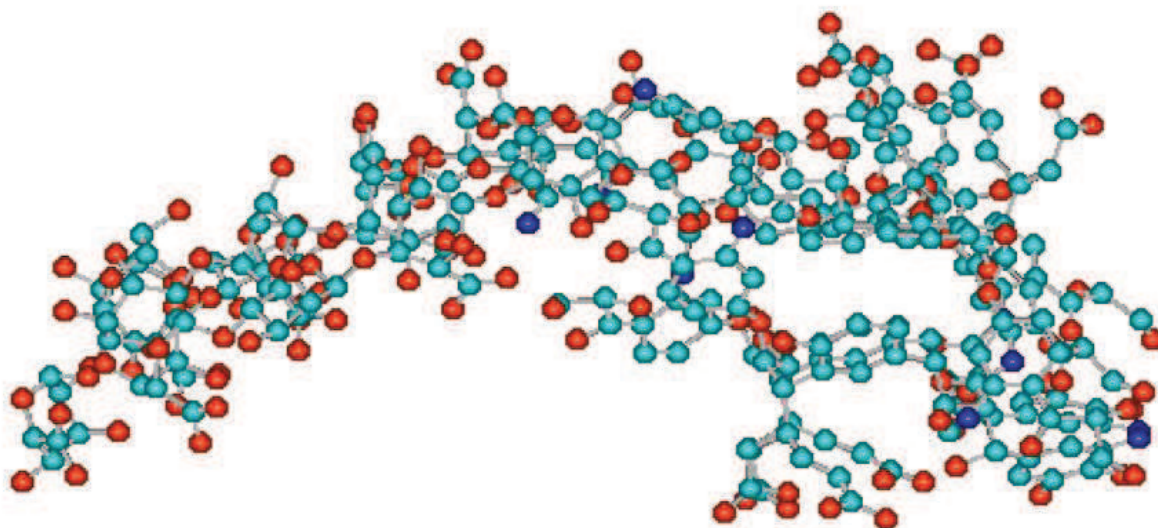
3. ábra. A humuszanyagok alapmolekulája (Islam és mtsai., 2005)

A HA lehetséges szerkezeti képletét a 4., a humuszanyagok alapmolekulájának egy lehetséges szerkezetét és térbeli elrendeződését az 5. ábra szemlélteti.



4. ábra. A HA lehetséges szerkezeti képlete (Schulten és Schnitzer, 1993)

A 3. és 4. ábrán látható, hogy a humuszanyagok vázát egymáshoz kapcsolódott heterociklikus és izociklikus aromás gyűrűk alkotják. A gyűrűk közvetlenül vagy hídkötéssel kapcsolódnak. Biológiai aktivitásukért főként a polifenol és a kinon típusú alkotórészek felelnek. A vázhoz kötődő oldalláncok savas (fenolos $-OH$, alkoholos $-OH$, karbonil és karboxil) vagy bázikus (imino és amino) jellegűek lehetnek.



5. ábra. A humuszanyagok alapmolekulájának egy lehetséges szerkezete és térbeli elrendeződése (Sein és mtsai.,1999) (ciánkék: C-atomok, piros: O-atomok, sötétkék: N-atomok, a H-atomok nincsenek jelölve)

Az 5. ábrán a humuszanyagok alapmolekulájának egy lehetséges térbeli konformációs állapotát mutatja. A delokalizált elektronszerkezetnek, valamint a nagyszámú, különféle funkció csoportnak köszönhetően mind az FA, mind a HA jó komplexképző és kationmegkötő. A szerkezetben kialakult üregekben szerves vagy szervetlen vegyületeket képes visszatartani, míg a környezeti változás (pl.: pH vagy ionerősség) hatására azok ki nem szabadulnak (Galambos, 2006).

5.4. A humuszanyagok legfontosabb fizikai, kémiai és biológiai reakciói

5.4.1. Oldhatóság

Minél nagyobb a molekula, annál nehezebben oldódik vízben. Ennek egyik oka, hogy a molekulaméret növekedésével fajlagosan csökken az aktív hidrofil csoportok száma. A másik ok pedig a molekulában található laktongyűrű, amely semleges és savas közegben záródik. Lúgos közegben viszont felnyílik a gyűrű, ezáltal megnő a hidrofil (COOH, OH) csoportok száma. Ez okozza a humuszanyagok lúgos közegben való jó oldhatóságát (Stevenson, 1982).

5.4.2. Reakciók szerves és szervesetlen molekulákkal

A humuszanyagok kémiai szerkezete lehetővé teszi, hogy gyakorlatilag a biológiai rendszerekben előforduló valamennyi vegyülettípussal reakcióba lépjenek.

A szervesetlen kationok ionos, komplex, kelát- és poláros adszorpciós kötésekkel kapcsolódhatnak a humuszanyagokhoz. A fő reakciópartnerek a savas karboxil- és, hidroxilcsoportok, de a karbonil- és szemikinoncsoportok is reagálhatnak.

A szervesetlen anionok nem tudnak közvetlenül kötődni a humuszanyagokhoz, de bizonyos körülmények között jó hatásfokkal lehet kötések kialakítani közöttük (Dos Santos és mtsai., 2007; Atalay és mtsai., 2009).

A szerves vegyületek reakciói a molekulaszervezettől függenek (pl. aromás, alifás, ionos). Kijelenthető, hogy majdnem minden esetben megtalálható a FA és a HA bármilyen molekulaszervezetű anyaggal történő kölcsönhatásba lépésének módja (Parris, 1980; Ye és mtsai., 2009).

5.4.3. Biológiai aktivitás

A humuszanyagok biológiai aktivitása régóta ismert tény. Ezen hatás magyarázatát – a modellel összhangban (3. ábra) – az alábbi példán keresztül érthetjük meg. A humuszanyagok szerkezetüknek köszönhetően elektron- és oxigénszállító molekulaként viselkednek a biológiai rendszerekben. Ez a képességük lehetővé teszi, hogy – hasonlóan a FADH₂ és NADH koenzimekhez – mint katalizátorok, részt vegyenek a sejtlégzési folyamatokban (Ioschenko, 1986; Adachi és mtsai., 1987).

A humuszanyagok elektronszállító tulajdonsága a kinon-szénkinon szerkezetnek, valamint a delokalizált elektronszerkezetnek köszönhető. Ezen feltevések helyességét Visser (1987) bizonyította.

5.4.4. Biostimulátor-hatás (energiatermelés a sejtekben)

A humuszanyagok, mint katalizátorok, felgyorsítják a sejtlégzési folyamatot és ezáltal – indirekt módon – a citrátkör energiatermelését. Visser (1987) azt találta, hogy a FA és a HA 40-360 mg/l ivóvíz adagban alkalmazva megnövelte a patkány májából izolált mitokondriumok légzésintenzitását. Ugyanebben a kísérletben azt is megállapította, hogy a sejtlégzés intenzitásának a szabadelektron-koncentráció a meghatározó kémiai tényezője és nem a molekulatömeg vagy az őrössavasság. Ezt bizonyítja az is, hogy *in vitro* körülmények között, a FA és a HA növelte a patkány májsejtjeiből izolált mitokondriumokban a NADH-oxidáz aktivitását (Ioschenko, 1986) és az oxidatív foszforiláció hatásfokát (Visser, 1987).

5.4.5. Toxicitás

A humuszanyagok toxicitását először Thiel és mtsai. (1981) vizsgálták. Megállapították, hogy a természetben előforduló humuszanyagok toxicitása rendkívül kicsi, így aggályok nélkül alkalmazhatók humán vagy állati étrend/takarmány-kiegészítőként. Ezt az állítást támasztja alá Lotosh (1991), aki a humuszanyagok LD₅₀ értékére 536 mg/ttkg-nál nagyobb dózist állapított meg. Ezt a legfrissebb kutatási adatok is alátámasztják (Dos Santos és mtsai., 2007).

5.5. Állatorvosi vonatkozások

A humuszanyagok biológiai aktivitása rendkívül sokrétű, ebből következik, hogy számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek az állatgyógyászatban is nagy jelentőségűek lehetnek. Az alábbiakban, az állatorvoslásban fontos hatásaikat foglalom össze.

5.5.1. A humuszanyagok hatása a termelési paraméterekre

Az utóbbi évtizedben egyre nagyobb mértékben terjed a humuszanyagokból készült termékek takarmányozási célú felhasználása, jóllehet a hatékonyságukkal kapcsolatos eredmények nem egyöntetűek. Számos kutató (Bailey és mtsai., 1996; Parks, 1998; Eren és mtsai., 2000) brojlereken hozamnövelő hatást mutatott ki a humuszanyagok takarmánnyal illetve ivóvízzel történő adagolásakor. Kocabagli és mtsai. (2002) különböző takarmányozási szakaszokban vizsgálták a Farmagülator DRYTM (humuszanyagból készült termék, Farmavet International) hatását a brojlercsirkék termelési paramétereire. A 2,5 g/kg Farmagülator DRYTM-val kiegészített brojlernevelő tápnak volt a legkedvezőbb (szignifikáns $p < 0,05$) hatása a súlygyarapodásra és a fajlagos takarmány-felhasználásra. Eren és mtsai. (2000) ugyanezen készítménynek (1,5 és 2,5 g/kg takarmány) hatását vizsgálták a brojlercsirkék teljesítményére a teljes hizlalási időszak alatt. Kísérletükben a nagyobb (2,5 g/kg) Farmagülator DRYTM-kiegészítés szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobb vágósúlyt eredményezett a 42. napra.

Weinreich és mtsai. (2002) már célzottan dóziszgörbét alkalmazva (0,3; 0,6; 1,2; 2,4; 4,8 g/kg takarmány) vizsgálták a humuszanyagok egyik fő alkotójának, a HA-nak a hatását brojler teljesítményére. A HA-kiegészítés a hizlalás teljes ideje alatt szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) javította a fajlagos takarmány-felhasználást. Legnagyobb koncentrációban (4,8 g/kg takarmány) alkalmazva az összes többi csoporténál kedvezőbb ($p < 0,05$) fajlagos takarmány-felhasználást eredményezett. Pulykákön végzett vizsgálatokban (Parks 1988) is ($p < 0,05$) javult a súlygyarapodás és a fajlagos takarmány-felhasználás a 8. és a 12. hét között, ugyanakkor ez a kedvező hatás már nem volt kimutatható a kísérlet

végén (20. hét). Yasar és mtsai. (2002) patkányok esetében is megállapítottak hozamfokozó hatást.

A fenti kísérleti eredményekkel szemben Bailey és mtsai. (1996) azt találták, hogy a takarmány 5 g/kg mennyiségben, Menefee[®] humáttal történő kiegészítése (Sundine Enterprises Inc.) nem befolyásolta az állatok (kakasok) súlygyarapodását, ugyanakkor ők is igazolták a fajlagos takarmány-felhasználás javulását. Ezzel ellentétben mások sem sertésekkel (Schumacher és Gropp, 2000), sem tojófürgékkel (Yalcin és mtsai., 2005) végzett kísérletekben nem tapasztaltak hozamnövelő hatást.

Feltételezve, hogy az FA és a HA nem azonos módon befolyásolja az élettani paramétereket, e két anyag elkülönült vizsgálatának eredményei magyarázatot adhatnak arra, hogy miért található a humuszanyagok hatásaival kapcsolatban ellentmondásos eredmények a szakirodalomban.

5.5.2. A humuszanyagok hatása az immunválasz-készségre

A humuszanyagokban gazdag tőzeget az ókor óta használták/használgák a gyógyfürdőkben sok fajta betegség külső kezelésére (Brandt, 1964; Eichelsdorfer, 1976; Klöcking, 1994). Azt, hogy a tőzeg elősegíti a sebgyógyulást az első világháborúban fedezték fel és fel is használták ezen kedvező tulajdonságát a katonák sérüléseinek gyógykezelésére (Haanel, 1924). A humuszanyagok immunstimuláns hatásuk révén javítják az állatok védekezőképességét a patogén baktériumok (pl. az E.coli) ellen, miáltal képesek csökkenteni a hasmenés előfordulási gyakoriságát (Humintech, 2004). A CVMP (Committee for Veterinary Medicine Products) jelentése alapján (1999) 1 mg/ttkg humát nyulakban, izomba adva, nem változtatta meg a hematológiai értékeket és a vér glükózkoncentrációját, ugyanakkor a globulin javára tolta el a plazmában az albumin/globulin arányát (főleg a β -globulin koncentrációja emelkedett).

Thiel és mtsai. (1981) az ammónium-humátot (100 μ g/ml) *in vitro* vírusellenesnek találták, ezt Klöcking és mtsai. (1994) sikerrel alkalmazták a herpes vírus által kiváltott bőrbetegség kezelésére. Schneider és mtsai. (1996) azt találták, hogy a hidrokinonból származó szintetikus humátanalógok megakadályozták a HIV vírus belépését a sejtbe, amit Van Rensburg és mtsai. (2002) igazolni tudtak a természetben előforduló humuszanyagokból kivonható oxihumáttal.

Jooné és mtsai. (2003) megállapították, hogy az oxihumát szignifikánsan növelte a fitohemagglutininnel stimulált limfociták IL-2-termelését (a sejtes immunválaszt) ugyanakkor a nem stimulált limfociták szintjére csökkentette az IL-10-szintézist. A 100 μ l/ml oxihumát tartalmú oldat hatására szintén szignifikánsan nőtt a stimulált limfociták CD25-ös (IL-2) receptorainak szintézise. Ezek az eredmények azt jelentik, hogy oxihumát hatására nő a

TH1 (IL-2 termelő) sejtek aktivitása, miközben a TH2-sejteké (IL-10 termelő) csökken, ami alapján feltételezhető, hogy az oxihumát befolyásolja az immunválaszt.

5.5.3. A humuszanyagok hatása a bélflórára

Az állatok bélmikroflórája fő-, kísérő- és maradványflórára tagolható. A főflóra tagjai főként tejsavat és rövidszénláncú zsírsavakat termelő anaerob fajok. A kísérőflóra fő képviselői az enterococcusok és a normál *E. coli*. A maradványflórához a potenciálisan kórokozó fajok sorolhatók.

A bélmikroflóra mindig jelent valamennyi terhelést a szervezet számára, ugyanakkor létezik egy egyensúlyi állapot, amelyben a gazdaállat és a bélmikroflóra a legkisebb terhelés mellett él együtt. Ez az állapot az eubiózis. Eubiózisban a főflóra részaránya >90%, a kísérőflóra 1% körüli, míg a maradványflóra részaránya 0,01% alatti. Az eubiotikus állapot alapvető fontosságú a fajlagos takarmány-felhasználás, a termelés és az egészség megtartása szempontjából (Gedek, 1989).

A humuszanyagoknak a mikrobák növekedésére kifejtett hatásával kapcsolatban kevés megbízható irodalmi forrás áll rendelkezésre. Ezt Chodan és Sobieraj (1966) vizsgálta először. A szerzők *in vitro* kísérleteikben megállapították, hogy míg egyes humátfrakciók baktericidek, addig mások serkentik a baktériumok növekedését. Mivel akkor még az antibiotikus hozamfokozás széles körben elterjedt volt, az 1990-es évek elejéig nemigen foglalkoztak a kutatók a humuszanyagok antimikrobás hatásának vizsgálatával. A kőszénből kivonható FA és a HA antibiotikus hatását és a terápiában való esetleges felhasználhatóságát Cloete és mtsai. (1990) írták le.

Néhány, nem szakirodalmi forrás (pl.: <http://www.apexinternetsales.com/%20.html>) a humuszanyagok baktériumokra kifejtett pozitív hatásáról számol be, mely szerint 300 ppm humát hatására a termőföldben 400-5000-szeres bakteriális aktivitást lehetett mérni. Fentiek alapján helytállónak tűnik Huck és mtsai. (1991) azon megállapítása, mely szerint a humuszanyagok mikrobákra kifejtett hatására vonatkozóan nem lehet megállapítani általános törvényszerűséget. A mikrobáktól függően ugyanis rendkívül különböző mértékben és irányba befolyásolhatják a vizsgált baktériumok növekedését. A kutatók végső következtetése az volt, hogy a humuszanyagok hatása nagymértékben függ a baktérium fajától, és a környezeti tényezőktől.

Riede és mtsai. (1991) a következő baktériumok estében mutatták ki a humuszanyagok növekedést gátló hatását: *Candida albicans*, *Enterococcus cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus pyogenes*.

Az ismertetett vizsgálat szerint a humuszanyagok gátolják néhány patogén baktérium növekedését, amelyet a Humin Tech (2004) eredményei is megerősítenek. Rámutatnak arra

is, hogy a humuszanyagok takarmányba keverése esetén nincs előírva élelmezés-egészségügyi várakozási idő, ami nyilvánvaló előny a gyógyszerekkel szemben. A Humin Tech (2004) szerint humuszanyagok esetén – mivel azok feltehetően nem direkt módon hatnak a baktériumokra – nem kell számolni a mikrobiális rezisztencia kialakulásával.

Ceylan és Ciftici (2002) antibiotikus hozamfokozók kiváltására alkalmas néhány „potenciális” anyagot vizsgált és megállapította, hogy a humuszanyagoknak a brojlertápokba való keverése ígéretes alternatívája lehet azoknak.

Islam és mtsai. (2005) a humuszanyagok hatást a következőképpen foglalták össze: „úgy tűnik, hogy a humuszanyagok az élő szervezetben az eubiotikus állapotot elősegítő baktériumokat támogatják, a kórokozókat pedig gátolják”.

5.5.4. A humuszanyagok hatása az antioxidáns rendszerre és a májra

A szervezet jól működő antioxidáns védelmi rendszerének köszönhetően minimális az oxidatív stressz okozta szövethárosodás. Ugyanakkor fontos hangsúlyozni, hogy az antioxidáns rendszerben fellépő bármilyen zavar vagy hiány – az oxidatív stressz megnövekedése révén – kóros állapot (pl.: különböző szívbetegségek, rák) kialakulásához vezethet (Aruoma, 1994).

Az antioxidánsok többféleképpen akadályozhatják meg a szubsztrát oxidációját:

- hozzáférhetetlenné teszik a szubsztrátot az oxidáló vegyület számára,
- enzim által katalizált folyamat keretében eltávolítják az oxidáló vegyületet a rendszerből,
- a szubsztrát helyett lépnek kémiai reakcióba az oxidáló szerrel, ezzel mintegy feláldozzák magukat a szubsztrátért.

Az utóbbi esetben, a nem enzimátikus úton működő antioxidánsok – mint pl. az aszkorbinsav – tulajdonképpen redukálószernek tekinthetők (Benzie és Strain, 1996). A humuszanyagok jó redukálóképességét számos publikáció tárgyalja (Szilágyi, 1973a; Szilágyi, 1973b; Skogerbae és Wilson, 1981; Loveley és mtsai., 1996). Kinoncsoportjaik segítségével nagyon könnyen vesznek fel elektront, és az így kialakuló hidroxikinon már könnyen adja át elektronját más molekulának (pl.: a Fe^{3+} -nak, amely ezáltal Fe^{2+} -vé alakul). Ez a sajátos kinon-hidroxinon átalakulás teszi képessé a humuszanyagokat arra, hogy elektronszállító-rendszerekben vegyenek részt (Loveley és mtsai., 1996). Ez a tulajdonságuk azonban nem csak előnyökkel jár. Ho és mtsai. (2002) kimutatták, hogy a HA felszabadítja a vasat a ferritinből a patkány májának mikroszómáiban és a keletkezett Fe^{2+} által növelheti a lipidperoxidációt. A két hatás együttesen megzavarhatja a redoxegyensúlyt, növelve a szervezetben az oxidatív stressz kockázatát.

Az FA májvédő hatását Béres és mtsai. (1957) igazolták. Kísérletükben széntetraklorid- és gyilkosgalóca-mérgezés esetében azt tapasztalták, hogy az FA májvédő és detoxikáló tulajdonsággal rendelkezik. Masilinski és mtsai. (1993) a HA hatását vizsgálták részben hepatektomizált patkányokon. Megállapították, hogy a HA hosszútávú alkalmazása során nőtt a májban a spermidin, a hisztamin, az RNS és a DNS koncentrációja a kontrollcsoporthoz képest. A HA-kiegészítést fogyasztó csoportok egyedeiben szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobb tömegű májat találtak, ami a HA májregenerációt elősegítő hatására utal.

5.5.5. A humuszanyagok hatása a pajzsmirigy működésére

A kőszénben és tőzegben gazdag területeken (pl.: USA egyes területei, Taiwan) – a jódpofilaxis ellenére – endemikus pajzsmirigy-működési zavar megjelenésével kell számolni, amelynek okaként az ivóvíz nagy humuszanyag-tartalmát teszik felelőssé (Gaitan és mtsai., 1978; Meyer és mtsai., 1978; Jolley és mtsai., 1983). Ezen anyagok főbb bomlástermékei a rezorcinol, orcinol, floroglucinol, pirogallol, 3,4; 3,5 dihidroxi-benzoosav, orto (o)- és meta (m)-ftálsav.

Jolley és mtsai. (1983) rezorcinolt találtak az e területekről származó vízmintákban (Columbia, USA), így a kutatások homlokterébe került a humuszanyagok bomlástermékeinek pajzsmirigyre kifejtett hatása. A vízminták vizsgálata azt is kimutatta, hogy a humuszanyagok szerkezeti felépítése – függetlenül a minta eredetétől – azonos (Burgess és mtsai., 1964; Choudhry, 1981; Gaitan, 1984).

Cooksey és mtsai. (1984) *in vitro* és *in vivo* kísérletekben igazolták, hogy a humuszanyagok bomlástermékei – az o- és m-ftálsav kivételével – csökkentik a pajzsmirigyműködést. Fontos viszont megjegyezni, hogy a természetben a ftálsavat a Gram negatív baktériumok dihidroxi-benzoosavra bontják (Keyser és mtsai, 1976), aminek a humuszanyagok bomlástermékeihez hasonló hatása van a pajzsmirigyre (Cooksey és mtsai., 1984). A természetben előforduló ftálsav prekürzora a dihidroxi-benzoosavnak. Gaitan és mtsai (1978 és 1984) pozitív korrelációt találtak a golyva előfordulási gyakorisága és a vizsgált vízminták ftálsavészter-tartalma között. Mindezek alapján azt valószínűsíthetjük, hogy a humuszanyagok vagy valamelyik összetevőjük (FA és/vagy HA) közvetlen és közvetett módon is befolyásolhatják a pajzsmirigyműködést. Mivel a kísérletekben nem „tisztított” anyagokat használtak, nem állapítható meg egyértelműen, hogy a humuszanyagok melyik összetevője (FA és/vagy HA) volt hatással a pajzsmirigyre. Indokoltnak látszott tehát egy olyan kísérlet elvégzése, amelyben a tisztított FA-nak, illetve HA-nak a kísérleti állatok pajzsmirigyműködésére kifejtett hatását vizsgáljuk az alkalmazott dózissal összefüggésben.

5.5.6. A humuszanyagok hatása az ásványianyag-transzportra

Az irodalomban számos adat található arra vonatkozóan, hogy a humuszanyagok javítják az ásványi anyagok transzportját (Kreutz és Schilkekewey, 1992; Yang, 1996; Dos Santos és mtsai., 2007). Egyik fontos tulajdonságuk, hogy – különböző fémekkel és oxidokkal reakcióba lépve – szinte végtelen számú vízdékony, vagy vízben oldhatatlan, komplex vegyületet hoznak létre (Boyd és mtsai., 1981; Senesi és mtsai., 1985; König és mtsai., 1986; Kang és mtsai., 1991; Livens, 1991; Islam és mtsai., 2005), Ismert, hogy a folyamat első lépéseként megkötik az ásványi anyagok jelentős részét (kelátképzés), az azonban nem tisztázott, hogy a nem egységes humuszanyagok melyik alkotórésze (FA, HA) játszik fontosabb szerepet az ásványi anyagok sejtmembránon keresztüli transzportjában. A fentiek alapján érthető, hogy a humuszanyagok befolyásolhatják a szervezetben a makro- és mikroelem-forgalmat. Mindezek ellenére csak kevés közlemény foglalkozik a humuszanyagoknak a mikroelemek felszívódására és azok különböző szervezetben lévő koncentrációjára kifejtett hatásával. Amennyiben a humuszanyagokat immunstimulánsként használják fel a takarmányozásban, igen lényeges szempont a mikroelem-forgalomra kifejtett hatás tanulmányozása.

5.5.7. A humuszanyagok gyulladáscsökkentő hatása

Yang és mtsai. (1996) a HA kifejezett gyulladáscsökkentő hatását tapasztalták a patkányok méhszarván és hasfalán előidézett mesterséges léziókon. Van Rensburg és mtsai. (2001) megállapították, hogy a kőszénből kivonható FA gyulladáscsökkentő.

5.5.8. A humuszanyagok hatása a véralvadásra és az oxigénszállításra

A vizsgálatok szerint (Buczko és mtsai., 1993) a HA igen széles tartományban (100-300 mg/ttkg) történő alkalmazása sem befolyásolta a patkányok véralvadását. Általánosságban is bizonyították, hogy a humuszanyagok növelték a vörösvértestek oxigénszállítási kapacitását (Lotosh, 1991). Ezt igazolja az a tapasztalat is, miszerint a humin készítményeket étrend-kiegészítőként fogyasztó emberek eufórikus érzésről számoltak be, ami a vörösvértestek humuszanyagok által megnövelt oxigénszállítási kapacitásának tulajdonítható. Ez a biológiai hatás igen fontos lehet a műtétek utáni regeneráció elősegítésére, mivel több oxigén jelenlétében gyorsabb a sebek gyógyulása is.

5.5.9. A humuszanyagok hatása a szöveti regenerációra

Az ilyen irányú vizsgálatok (Kreutz és Schlikekewey, 1992; Lubitskaia és Ivanov, 1999) megállapították, hogy a humuszanyagok a kollagén rostokhoz kötődnek, elősegítve a károsodott inak és a csont regenerálódását.

5.5.10. A humuszanyagok vírusellenes hatása

A humuszanyagok vírusellenes hatását az alábbi vírusok esetében mutatták ki eddig:

- rhinovírus (Enviromate, 2002),
- coxsackie vírus A9, herpes simplex vírus 1-es és 2-es típus (Schiller és mtsai., 1979; Thiel és mtsai., 1977, 1981; Knocking, 1991; Laub, 1998a, 1998b),
- HIV (Laub, 1995, 2000; van Rensburg és mtsai., 2002),
- influenza vírus A és B típus (Laub, 2000; Enviromate, 2002),
- ragadós száj és körömfájás (Schultz, 1965).

5.5.11. A humuszanyagok higiéniai vonatkozásai

Parker és mtsai. (2001) megállapították, hogy a humuszanyagok használata az állati eredetű hulladékok és szennyező anyagok kezelésben 64%-al csökkenti az illékony ammónia mennyiségét, mérsékli a kellemetlen szagot, növeli a nitrogén/foszfor arányát. A kutatók olyan humuszanyagokat tartalmazó takarmányreceptúrák kialakításán dolgoznak, amelyek csökkentik az állati ürülék környezetszennyező voltát, ugyanakkor megőrzik, esetleg javítják a termelés hatékonyságát (Mosley, 1996; Greene és Cole, 2000).

6. CÉLKITŰZÉSEK

A munkám során két kísérletet végeztem.

Az első kísérlet célja az volt, hogy választ kapjak az alábbi kérdésekre.

- Befolyásolja-e az FA_D és a HA_D az ovalbuminnal immunizált patkányok takarmányfelvételét, testsúlyát, súlygyarapodását és fajlagos takarmányfelhasználását?
- Amennyiben igen, dóziszfüggő-e a hatás?
- Azonos vagy eltérő az FA_D és a HA_D hatása és oka lehet-e ez a szakirodalomban található ellentmondásoknak?
- Melyik humuszanyag-frakcióhoz (FA_D és/vagy HA_D) köthető és milyen mértékben a humuszanyagokra vonatkozóan az irodalomban közölt immunstimuláns hatás?
- Mi az optimális dózisa az aktív anyagnak (FA_D és/vagy HA_D)?
- Milyen típusú (humorális, és/vagy celluláris) immunválaszra hat az FA_D illetve a HA_D?
- Befolyásolja-e a takarmány FA_D- és HA_D-kiegészítése az egyes – a fő, kísérő- és maradványflórához tartozó – baktériumcsoportok (tejsavtermelők, coliformok és szulfitredukáló anaerob rothasztók) számát a kísérleti patkányok vastagbél-tartalmában?
- Módosítják-e a tesztanyagok a bélflóra egyensúlyi állapotát?
- Amennyiben igen, dóziszfüggő-e a hatás?
- Hat-e az FA_D illetve a HA_D a vérplazma összantioxidáns-kapacitására?
- Van-e májkárosító hatásuk (AST-aktivitás vizsgálata, szövetten)?
- Kimutatható-e dóziszfüggő hatás?
- Hat-e az FA_D, illetve a HA_D a vérplazma TSH, T3, T4 koncentrációjára és a T4/T3-hányadosra?
- Melyik humuszanyag frakcióhoz köthető az esetleges hatás?
- Dóziszfüggő-e a feltételezett hatás?
- Befolyásolja-e az immunstimuláció céljából adott FA_D és HA_D a Fe, Cu, Zn és Mn koncentrációját a vastagbél-tartalomban és a vizsgált szervekben (máj, vese, combcsont, szőr)?
- Amennyiben igen, azonos vagy eltérő hatású-e a két vizsgálati anyag?
- Dóziszfüggő-e a mért hatás?

A második kísérlet célkitűzései az alábbiak voltak.

- Az immunológiai eredményeinek ellenőrzése az első kísérletben megállapított optimális dózissal.
- Annak megállapítása, hogy növeli-e a celluláris immunválasz intenzitását az FA_D illetve a HA_D és hat-e az FA_D és a HA_D az immunválasz időbeli lefolyására.

7. ANYAG ÉS MÓDSZER

7.1. Első kísérlet

A kísérletet 72, Whistar CRL:(WI) BR törzsből származó, SPF, hím, választott patkánnyal végeztem. A patkányokat 4 nap szoktatás után testsúly szerint 8-8 egyedből álló kísérleti csoportokba osztottam oly módon, hogy a csoportok átlagos kezdő súlya gyakorlatilag azonos, a csoportokon belüli szórás pedig minimális legyen. Az állatokat egyedi ketrecekben helyeztem el és 24°C-os teremhőmérsékletet biztosítottam a kísérlet alatt. A takarmány és az ivóvíz *ad libitum* állt rendelkezésre. A kísérleti tápokot az Intézet laboratóriumában állítottam össze az Amerikai Táplálkozástudományi Intézet (American Institute of Nutrition) AIN-93G receptúrája alapján. A 8 kísérleti csoportban a kontrolltápot az alábbiak szerint egészítettem ki a tesztanyagokkal:

- kontroll,
- kontroll + 0,1% FA_D,
- kontroll + 0,2% FA_D,
- kontroll + 0,4% FA_D,
- kontroll + 0,8% FA_D,
- kontroll + 0,1% HA_D,
- kontroll + 0,2% HA_D,
- kontroll + 0,4% HA_D,
- kontroll + 0,8% HA_D.

A kísérlet 2. napján 200 µg ovalbumint, 400 µl komplett Freund adjuvánst és 400 µl foszfátpuffer-oldatot tartalmazó szuszpenzióval, intraperitoneálisan immunizáltam a patkányokat. A patkányok testsúlyát és takarmányfogyasztását hetente háromszor (hétfő, szerda, péntek) mértem. A 26 napos etetési időszak végeztével narkotizáltam (90 mg/ttkg CP ketamin és 0,5 mg/ttkg medetomidin) és elvégeztem a patkányokat. A vérplazmát fagyasztva tároltuk a további vizsgálatokig. Az immunológiai vizsgálatokat az Országos Állategészségügyi Intézet Immunológiai osztályán ELISA teszttel (Renz és mtsai. 1993) végeztem. A lemezeket Multiskan MS Primary EIA V. 1.8-0 berendezéssel és szoftverrel 450 nm-en értékeltem ki.

Az adatok elemzésére egytényezős varianciaanalízist (ANOVA), LSD-tesztet és Dixon-féle próbát végeztünk STATISTICA 6 (Statsoft, Inc. 2003) szoftvercsomaggal.

A kísérleti állatok tartási körülményei és kezeléseinek lebonyolítása megfelelt az EGK 86/609 irányelvében foglaltaknak. A kísérletet a hatályos magyar állatvédelmi törvényben (XXVIII/1998-FVM) foglaltak szerint végeztük. Az Állatorvos-tudományi Kar engedélyszáma: 26/2005.

A vizsgálatok elvégzését a 49116 sz. OTKA- és a 15939 sz. NKB-pályázatok tették lehetővé.

1. táblázat. A módosított AIN-93G rágcsálótáp összetétele (NRC 1995)

Összetevők	(%)
Kazein	22,00
Maltodextróz	12,00
Szaharóz	8,00
Kukoricacsíra-olaj	7,00
Kukoricakeményítő	36,00
Cellulóz	5,00
AIN-93G ásványianyag-keverék	3,50
AIN-93VX vitaminkeverék	1,00
L-cisztin	0,20
DL-metionin	0,10
Kolin-klorid	0,18
Antioxidáns	0,02
Előkeverék*	5,00

*Előkeverék: kukoricakeményítő, a tesztszoportoknál kukoricakeményítővel homogenizált tesztanyag.

AIN-93G ásványianyag-keverék	
Összetevők	g/kg
Kalcium-karbonát	357,00
Kálium-dihidrogén-foszfát	196,00
Kálium-citrát H ₂ O	70,78
Nátrium-klorid	74,00
Kálium-szulfát	46,60
Magnézium-oxid	24,00
Vas-citrát	6,06
Cink-karbonát	1,65
Mangán-karbonát	0,63
Réz-karbonát	0,30
Kálium-jodát	0,01
Nátrium-szelenit	0,01025
Ammonium-paramolibdát 4H ₂ O	0,00795
Nátrium-metaszilikát 9H ₂ O	1,45
Króm-kálium-szulfát 12H ₂ O	0,275
Lítium-klorid	0,0174
Bórsav	0,0815
Nátrium-fluorid	0,0635
Nikkel-karbonát	0,0318
Ammonium-vanadát	0,0066
Kukoricakeményítő	221,026

AIN-93VX vitaminkeverék	
Összetevők	Mennyiség (mg/kg)
Niacin	3000
Kalcium-pantotenát	1600
Piridoxin HCl	700
Tiamin HCl	600
Riboflavin	600
Folsav	200
Biotin	20
E-vitamin acetát (500 NE/g)	15000
B ₁₂ vitamin (0,1%)	2500
A-vitamin-palmitát (500000 NE/g)	800
D ₃ -vitamin (400,000 NE/g)	250
K ₁ -vitamin (fillokinon)	75
Kukoricakeményítő	974655

Az FA_D-t és a HA_D-t dr. Csicsor János az ORGANIT Kft. (H-8175 Balatonfűzfő, Ipari park 1498/279 hrsz.) tulajdonosa bocsátotta rendelkezésemre.

A tesztanyagok előállításánál során a Bakony-hegységben lévő Dudar község közelében bányászott, 10% dudarittartalmú port az IHSS (International Humic Substance Society) által elfogadott standard módszerrel (Swift, 1996) választják szét FA_D-ra és HA_D-ra, amivel kémiailag tiszta FA_D és HA_D állítható elő.

Az ellenanyag-titer meghatározása

A vizsgálatot az MGSZH Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságának Virologiai osztályán végeztem ELISA-módszerrel (Renz és mtsai., 1993) végeztem, a lemezeket Multiskan MS Primary EIA V. 1.8-0 berendezéssel és szoftverrel 450 nm-en értékeltem ki.

A vastagbél-tartalom-minták feldolgozásának elve

A mintákat aseptikus körülmények között, üvegbottal homogenizáltam, majd azokból csoportonként 10-10 g-ot mértem ki, amelyeket 90 ml steril hígító folyadékban egyenletesen szuszpendáltam. Így 1:10 arányú alaphígítású vizsgálati anyaghoz jutottam.

Az alaphígítású mintából kiindulva decimális hígítási sort készítettem. Célszerűen úgy jártam el, hogy 2 ml 1:10-es hígítású szuszpenziót 18 ml steril hígító folyadékkal homogenizáltam (1:100-as hígítás). A további hígítások (1:1000-es, 1:10000-es, stb.) úgy készültek, hogy az előző hígítás egy térfogategységét kilencszeres mennyiségű hígító folyadékkal homogenizáltam az ISO 6887-1:1999. szabványban rögzítettek szerint.

A decimális hígítási sorokká alakított vastagbél-tartalom-suszpenziókból a tejsavtermelő mikrobák, a szulfitredukáló anaerobok (clostridiumok) és a coliform baktériumok grammonkénti telepképző számát (colony forming unit, CFU) határoztam meg.

Alkalmazott táptalajok, leoltási és inkubálási módszerek

Tejsavtermelők

Chalmers-agar, felületi szélesztés és telepszámlálás.

Inokulum: 0,1ml/agarlemez.

Inkubálás: 37°C, 48 óra, 10% CO₂ tartalmú termosztát (Horváth, 1980).

Coliform baktériumok

Drigalski agar, felületi szélesztés és telepszámlálás.

Inokulum: 0,1ml/agarlemez.

Inkubálás: 37°C, 48 óra, közönséges termosztát.

(Az MSZ 6977-87 szabvány szerint.)

Szulfitredukáló anaerobok

Félfolyékony, oxigénmentes Takács-Narayan szulfitagar. Csőöntéses magasagar módszer, telepszámlálással.

Inokulum: 1ml/cső.

Inkubálás: 37°C, 48 óra, közönséges termosztát.

(Az MSZ 6977-87 szabvány szerint.)

Minden mikrobacsoport esetében, valamennyi hígításból 5-5 párhuzamos vizsgálatot végeztem.

A tenyészetek bírálata és kiértékelése

48 órás inkubáció után a különböző hígítású mintákkal nyert tenyészetek elbírálásakor az indikátorcsírák grammonkénti számának megállapításához azokat az agarlemezeket vettem figyelembe, amelyeken 15-150 jellegzetes telep fejlődött, míg a szulfitredukáló anaerobok esetében az 1-15 jellegzetes fekete telepet tartalmazó csöveket értékeltem (Mackey és Derrick, 1979).

A minta hígításának és az inokulum mennyiségének figyelembe vételével határoztam meg az egyes párhuzamos minták csíraszámát. Az öt párhuzamos vizsgálat számtani átlaga képezte az adott csíracsoportra vonatkozó értéket, amelyeket a vizsgálati eredményekben szerepeltetek.

FRAP

A vérplazma összantioxidáns-kapacitását a plazma vasredukáló képességének spektrofotometriás mérésével (FRAP-módszer, Benzie és Strain, 1996) határoztam meg.

AST

A minták AST-aktivitását a Diagnoszticum Rt. (Magyarország) reagenskészlete segítségével határoztam meg.

A T₃ és T₄ meghatározása

A plazma T₃- és T₄-szintjét a Magyar Izotóp Intézet által kifejlesztett ¹²⁵I-3 coated-spec, -RIA kitékkel történt.

A TSH meghatározása

A vérplazma rTSH-szintjének meghatározását a Magyar Izotóp Intézet végezte RIA-módszerrel.

A minták mikroelem-tartalmának meghatározása

A minták vas-, cink-, réz- és mangánkoncentrációjának vizsgálata az alábbi két lépésben történt.

1. Minta-előkészítés

A patkánykísérlethez az alaptápra kevert FA_D és HA_D, valamint az etetett tápok mikroelem-koncentrációjának meghatározását az intézet laboratóriumában végeztük. Az említett anyagokból két párhuzamos méréshez 1,00-1,00 g-ot mértünk be a MILESTONE MWD 1200 MLS típusú mikrohullámú roncsolókészülék edényeibe. Ehhez 8,0-8,0 cm³ tömény salétromsavoldatot adtunk hozzá és az edényeket szűrőpapírral letakarva vegyifülke alatt egy éjszakán át állni hagytuk.

A szárítószekrényben előzetesen megszáritott máj-, vese- és vastagbél-tartalom-minták, valamint a combcsont- és szőrminták oldatba vitelét ugyancsak mikrohullámú roncsolással végeztük. A megszáritott szervmintákat a roncsolás előtt dörzsmozsárban porrá törtük, majd 1,00-1,00 g-ot mértünk be a roncsoló edényekbe. A vesék vizsgálatához mindkét vesét felhasználtuk.

A mikrohullámú roncsolásnál viszonylag kíméletes energiaközlést alkalmaztunk az alábbiak szerint:

- 1. lépés 200 W, 4 perc,
- 2. lépés 300 W, 2 perc,
- 3. lépés 400 W, 2 perc,
- 4. lépés 500 W, 2 perc.

A roncsolás befejezése után lehűtöttük a mintákat tartalmazó rotort, majd az edényeket jó elszívással rendelkező vegyifülke alatt óvatosan kinyitottuk és a keletkezett nitrózus gőzök

eltávozásáig állni hagytuk a fülke alatt. A roncsolóedényekből desztillált vízzel 25 cm³-es mérőlombikokba mostuk át a tartalmukat, majd jelig feltöltöttük.

A mikroelem-koncentráció meghatározása

A fent leírt módon előkészített mintaoldatok, illetve a vastagbél-tartalom-, a máj-, a vese-, a combcsont- és a szőrminták vas-, réz-, cink- és mangán-koncentrációját, Carl Zeiss Jena AAS3 típusú atomabszorpciós spektrométerrel határoztuk meg.

Az eredményeket mg/kg szárazanyagegységben adtam meg.

7.2. Második kísérlet

A második kísérletet 30 , 8 hetes Wistar CRL:(WI) BR nőstény patkánnyal végeztem. 4 napos alkalmazkodási időszak után 3 csoportra osztottam az állatokat (10 állat minden csoportba) oly módon, hogy a csoportok átlagos súlya gyakorlatilag azonos, a szórás pedig minimális legyen. A kísérlet során a tartási és takarmányozási körülmények megegyeztek az első kísérletnél leírtakkal.

A kísérletben az első vizsgálat alapján az immunizálás szempontjából optimálisnak (0,4%) bizonyult FA_D- illetve HA_D-koncentrációval dolgoztam az alábbi elrendezés szerint:

- Kontroll,
- 0,4% FA_D,
- 0,4% HA_D.

A kísérlet második napján immunizáltam az állatokat (150 µg ovalbumin 150 µl inkomplett Freund adjuváns és 150 µl foszfátpufferoldat szuszpenziójával sc.). A 14. napon farokcsontkolás módszerével vért vettem az immunológiai vizsgálatokhoz. A vizsgálat 26. napján narkotizáltam (90 mg/ttkg CP ketamin és 0,5 mg/ttkg medetomidin) és elvégeztem a patkányokat, majd összegyűjtöttem a vér- valamint a szövettani vizsgálatokhoz szükséges mintákat (lép és vékonybél).

Ellenanyag-titer-vizsgálat

A vizsgálat a Szent István Egyetem Járványtani és Mikrobiológiai tanszékén ELISA-módszerrel (Renz és mtsai., 1993), a lemezek kiértékelése Multiskan MS Primary EIA V. 1.8-0 berendezéssel és szoftverrel 450 nm-en történt.

Limfocitastimulációs vizsgálat

A celluláris immunválaszt *in vitro* limfocitastimulációs tesztben (LST), a Nochta és mtsai. (2008) által leírtak alapján végeztem.

Az OD-értékét ELISA-leolvasón (Multiskan EX, Labsystems, USA) 550 és 650 nm-en mértem, 4 órás, 37°C-on történt inkubálást követően. Az 550 nm-en mért értékeket korigáltam a 650 nm-en mért háttérértékkel.

Szövetteni vizsgálat

Szövetteni vizsgálatra csoportonként 3 állatból vettem mintát. A minták feldolgozását az Országos Állat-egészségügyi Intézetben végezték a következők szerint: az epésbélből, az éhbélből, a csípőbélből, és a lépből vett mintákat 10%-os, pufferolt formaldehidoldatban fixálták. Ezek után előírás szerint vegyszeroldatokban víztelenítették, majd paraffinba ágyazták azokat. Az így elkészült paraffinblokkokról 3-4 µm vastagságú metszeteket készítettek, amelyeket a paraffin kivonása után – általános tájékoztató vizsgálat céljából – hematoxilin-eozinnal festettek.

Hisztometriai analízist végeztek az állatok vékonybél-nyálkahártyáján, valamint a lép limfoidsejtes zónáin.

Az epésbélben, az éhbélben és a csípőbélben harántmetszésű síkban határozták meg a bolyhok hosszúságát és szélességét, valamint a hámréteg vastagságát. Az eredményeket 10-10 objektum ocular mikrométerrel történt mérése alapján (mikrométerben, µm) 3-3 állat átlagában adták meg csoportonként.

A lépmintákban a „T”-dependens limfocitáknak megfelelő periarteriolaris limfoid sejtzónát (PALS), valamint a „B”-dependens limfocitáknak megfelelő marginális limfoid sejtzónát – ugyancsak 10-10 objektum mérése alapján – átlagértékben adták meg.

Értékeltek a bélnyálkahártya különböző rétegeit, a bélbolyhok hámrétegét és kötőszöveti rétegét (a stratum villosumot), a bolyhok esetleges syncytialis összeolvadását (fúzióját), a megszálesbedésük háttérében felismerhető sejtes (limfocitás, hisztiocitás) beszűrődést, a limfoid folliculusok (Payer-plaque-ok) morfológiáját, továbbá a kehelysejtek (Goblet cells) aktivitásának morfológiai jeleit.

A kórszövetteni vizsgálat az EÜM és az FVM 9/2001. (03.30.) számú, az emberi felhasználásra kerülő gyógyszerekre és növényvédő szerekre vonatkozó helyes laboratóriumi gyakorlat alkalmazásáról és ellenőrzéséről szóló közös rendeletével, valamint a Good Laboratory Practice for Testing of Chemicals (OECD, 1997) irányelveivel összhangban, az Országos Állategészségügyi Intézet Kórszövetteni Laboratóriumában hatályos ide vonatkozó Szabvány Műveleti Leírások szerint végezték el.

Az adatok elemzésére egytényezős varianciaanalízist (ANOVA), LSD tesztet és Dixon-féle próbát végeztünk STATISTICA 6 (Statsoft, Inc. 2003) szoftvercsomaggal.

A kísérleti állatok tartási körülményei és kezeléseinek lebonyolítása megfelelt az EGK 86/609 irányelvében foglaltaknak. A kísérletet a hatályos magyar állatvédelmi törvényben (XXVIII/1998-FVM) foglaltak szerint folytattuk le. Az Állatorvos-tudományi kar engedélyszáma: 67/2010.

A vizsgálatok elvégzését a 49116 sz. OTKA- és a 15939 sz. NKB-pályázatok tették lehetővé.

8. EREDMÉNYEK, MEGBESZÉLÉS

8.1. A fulvosav és a huminsav hatása az immunizált állatok súlygyarapodására, takarmányfogyasztására és fajlagos takarmányfelhasználásra

8.1.1. Eredmények

Takarmányfelvétel

A takarmányfelvételre vonatkozó adatokat a 2. táblázatban foglaltam össze. Az objektív összehasonlíthatóság érdekében az értékek g/nap/100 g testsúly egységben mutatják az egyes mérési időpontok közötti, valamint a teljes kísérleti időtartamra vonatkozó takarmányfogyasztást.

2. táblázat. A tápok FA_D- és HA_D-kiegészítésének hatása a patkányok takarmányfelvételére

		Kontroll	FA _D -kiegészítés (%)					HA _D -kiegészítés (%)			
		(n = 8)	(n = 8)					(n = 8)			
		0	0,1	0,2	0,4	0,8	0,1	0,2	0,4	0,8	
Takarmányfelvétel (g/nap/100 g testsúly)											
0-7.nap	Átlag	15,27	14,65	15,11	14,14	14,61	14,58	14,98	15,11	15,82	
	Szórás	1,73	1,12	1,15	1,31	1,02	0,63	1,66	0,71	1,37	
8-14. nap	Átlag	13,02	12,78	13,00	12,37	12,33	12,74	13,01	13,19	13,05	
	Szórás	1,36	0,53	1,05	0,79	0,62	0,55	1,13	0,49	0,95	
15-21. nap	Átlag	8,54	8,42	8,50	7,84	7,94	8,97	8,73	9,13	8,62	
	Szórás	1,24	1,15	1,42	1,19	0,96	1,31	0,99	0,51	1,20	
22-26. nap	Átlag	9,46	8,76	9,32	8,41	8,76	9,23	9,60	9,50	9,59	
	Szórás	1,23	0,93	1,02	0,20	1,25	0,76	1,89	1,17	2,17	
0-26. nap	Átlag	18,15	17,32	17,93	16,63	16,68	17,37	18,09	18,51	18,64	
	Szórás	2,49	2,00	1,52	1,21	1,47	1,21	1,87	1,18	2,57	

A táblázat adataiból látható, hogy nem volt szignifikáns különbség sem a kontroll- és az egyes kísérleti csoportok között, sem a kísérleti csoportok egymással történő összevetésekor.

A 3. táblázat az alkalmazott dózisokat összevonva, egy-egy csoportként mutatja az FA_D- illetve a HA_D-kiegészítés hatását.

3. táblázat. A tápok FA_D- és HA_D-kiegészítésének hatása a patkányok takarmányfelvételére (az FA_D- és HA_D-adatok dózistól függetlenül összevonva)

		Kontroll (n = 8)	FA _D (n = 40)	HA _D (n = 40)
		Takarmányfelvétel (g/nap/100 g testsúly)		
0-7.nap	Átlag	15,27	14,63	15,12
	Szórás	1,73	1,15	1,21
8-14. nap	Átlag	13,02	12,63	12,99
	Szórás	1,36	0,79	0,80
15-21. nap	Átlag	^{ab} 8,54	^a 8,18	^b 8,86
	Szórás	1,24	1,17	1,02
22-26. nap	Átlag	9,46	8,84	9,48
	Szórás	1,23	0,97	1,52
0-26. nap	Átlag	^{ab} 18,15	^a 17,14	^b 18,15
	Szórás	2,49	1,59	1,78

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

A táblázati adatok g/nap/100 g testsúly egységben mutatják az egyes mérési időpontok közötti (heti), valamint a teljes kísérleti időtartamra vonatkozó takarmányfogyasztást. Ez utóbbi alapján látható, hogy az FA_D-nak és a HA_D-nak a takarmányfelvételre kifejtett hatása a 15. és 21. nap közötti időszakban és a kísérlet teljes időtartamára nézve szignifikánsan ($p < 0,05$) eltért egymástól. Az FA_D-csoportban, mindkét időintervallumban szignifikánsan ($p < 0,05$) kisebb volt a takarmányfelvétel a HA_D-csoportéhoz képest. A kontrollhoz viszonyítva viszont egyik esetben sem volt szignifikáns eltérés.

Testsúly és súlygyarapodás

A testsúlyra vonatkozó adatok a 4. táblázatban láthatók. Az értékek g-ban mutatják az egyes csoportok átlagsúlyát a különböző mérési időpontokban.

4. táblázat. A testsúlyok alakulása a kísérlet során

		Kontroll	FA _D -kiegészítés (%)					HA _D -kiegészítés (%)			
		(n = 8)	(n = 8)					(n = 8)			
		0	0,1	0,2	0,4	0,8	0,1	0,2	0,4	0,8	
Testsúly (g)											
0.nap	Átlag	97,26	97,26	97,24	97,44	97,29	97,30	97,24	97,41	97,28	
	Szórás	10,39	9,98	10,46	10,28	8,92	7,45	9,28	7,14	9,29	
7. nap	Átlag	145,48	143,38	144,48	146,58	141,56	141,59	143,35	144,69	147,86	
	Szórás	12,24	9,74	15,49	11,56	12,30	8,87	11,66	12,73	10,06	
14. nap	Átlag	191,89	190,15	194,85	195,68	188,96	185,45	191,78	193,73	196,50	
	Szórás	10,02	12,77	14,96	13,18	14,06	14,43	13,43	17,41	9,28	
21. nap	Átlag	221,25	211,90	219,50	207,36	207,75	210,83	221,60	227,79	223,56	
	Szórás	11,65	4,69	19,00	16,06	16,23	14,94	21,96	22,10	14,15	
26. nap	Átlag	248,11	228,84	248,05	238,25	224,83	233,69	251,49	256,98	250,58	
	Szórás	17,43	7,97	21,44	37,73	14,57	16,21	30,22	28,88	20,35	

A táblázat adataiból látható, hogy nem volt szignifikáns különbség sem a kontroll- és az egyes kísérleti csoportok között, sem a kísérleti csoportok egymással történő összevetésekor.

A 5. táblázat az alkalmazott dózisokat összevonva, egy-egy csoportként mutatja az FA_D- illetve a HA_D-kiegészítés hatását.

5. táblázat. A testsúlyok alakulása a kísérlet során (FA_D- és HA_D-adatok dózistól függetlenül összevonva)

		Kontroll	FA _D	HA _D
		(n = 8)	(n = 40)	(n = 40)
Testsúly (g)				
0.nap	Átlag	97,26	97,31	97,31
	Szórás	10,39	9,44	7,94
7. nap	Átlag	145,48	144,00	144,37
	Szórás	12,24	11,97	10,65
14. nap	Átlag	191,89	192,41	191,86
	Szórás	10,02	13,41	13,88
21. nap	Átlag	^{ab} 221,25	^a 211,76	^b 220,94
	Szórás	11,65	15,31	18,85
26. nap	Átlag	^{ab} 248,11	^a 235,19	^b 248,18
	Szórás	17,43	24,21	25,02

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

A táblázat adataiból látható, hogy az FA_D-nak és a HA_D-nak a testsúlyra kifejtett hatása nem tér el szignifikánsan a kontrolltól, ugyanakkor a kísérlet vége felé (21. és 26. nap) a FA_D-s kiegészítést fogyasztó egyedek testsúlyának átlaga szignifikánsan ($p < 0,05$) kisebb, mint a HA_D-seké.

A súlygyarapodásra vonatkozó adatokat a 6. táblázatban foglaltam össze.

6. táblázat. A tápok FA_D- és HA_D-kiegészítésének hatása a patkányok súlygyarapodására

		Kontroll (n = 8)	FA _D -kiegészítés (%) (n = 8)				HA _D -kiegészítés (%) (n = 8)				
		0	0,1	0,2	0,4	0,8	0,1	0,2	0,4	0,8	
		Súlygyarapodás (g/nap/100 g testsúly)									
0-7.nap	Átlag	7,15	6,85	6,96	7,29	6,53	6,54	6,82	6,93	7,50	
	Szórás	1,05	0,93	1,03	1,22	1,04	0,86	1,02	0,90	1,23	
8-14. nap	Átlag	4,61	4,67	5,05	4,80	4,81	4,42	4,85	4,84	4,73	
	Szórás	0,94	0,53	0,84	0,44	0,45	0,78	0,62	0,43	0,53	
15-21. nap	Átlag	2,21	2,08	1,83	1,36	1,44	1,99	2,22	2,51	1,97	
	Szórás	0,94	0,98	1,00	1,17	0,94	0,96	1,11	0,51	0,78	
22-26. nap	Átlag	2,42	1,73	2,62	2,13	1,68	2,19	2,70	2,54	2,41	
	Szórás	0,92	0,83	1,07	1,50	0,85	1,07	1,64	0,50	1,11	
0-26. nap	Átlag	6,07	5,57	6,01	5,53	5,26	5,43	6,14	6,30	6,15	
	Szórás	1,30	1,09	0,84	0,80	0,24	0,91	1,09	0,79	1,36	

A táblázat adataiból kiderül, hogy nem volt szignifikáns különbség sem abban az esetben, amikor a kontrollt az egyes kísérleti csoportokhoz hasonlítottam, sem a kísérleti csoportok egymással történő összevetésekor.

A 7. táblázat az alkalmazott dózisokat összevonva, egy-egy csoportként mutatja az FA- illetve a HA-kiegészítés hatását.

7. táblázat. A tápok FA_D- és HA_D-kiegészítésének hatása a patkányok súlygyarapodására (FA_D- és HA_D-adatok dózistól függetlenül összevonva).

		Kontroll	FA _D	HA _D
		(n = 8)	(n = 40)	(n = 40)
		Súlygyarapodás (g/nap/100 g testsúly)		
0-7.nap	Átlag	7,15	6,90	6,89
	Szórás	1,05	1,04	0,97
8-14. nap	Átlag	4,61	4,77	4,71
	Szórás	0,94	0,43	0,60
15-21. nap	Átlag	^a 2,47	^b 1,68	^a 2,17
	Szórás	0,61	1,02	0,86
22-26. nap	Átlag	2,42	2,08	2,34
	Szórás	0,92	0,82	0,89
0-26. nap	Átlag	6,07	5,61	6,00
	Szórás	1,30	0,81	1,06

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

A táblázatban g/nap/100 g testsúlyban tüntettem fel a súlygyarapodást az egyes mérési időszakokban. Látható, hogy a 15-21. nap között a FA_D-s kiegészítést fogyasztó egyedek súlygyarapodása szignifikánsan ($p < 0,05$) kevesebb volt mind a kontrollnál, mind a HA_D-s csoportnál.

Fajlagos takarmány-felhasználás

A fajlagos takarmány-felhasználásra vonatkozó adatokat a 8. táblázat szemlélteti. Az értékek a mérési időszakokra vonatkozóan g/g-ban mutatják az egyes csoportok fajlagos takarmány-felhasználását.

8. táblázat. A tápok FA_D- és HA_D-kiegészítésének hatása a patkányok fajlagos takarmány-felhasználására

		Kontroll	FA _D -kiegészítés (%)					HA _D -kiegészítés (%)			
		(n = 8)	(n = 8)					(n = 8)			
		0	0,1	0,2	0,4	0,8	0,1	0,2	0,4	0,8	
		Fajlagos takarmány-felhasználás (g/g)									
0-7.nap	Átlag	2,15	2,16	2,12	1,96	2,27	2,25	2,23	2,21	2,13	
	Szórás	0,14	0,21	0,15	0,20	0,30	0,22	0,16	0,24	0,20	
8-14. nap	Átlag	2,89	2,76	2,67	2,58	2,62	2,96	2,70	2,68	2,78	
	Szórás	0,40	0,27	0,14	0,09	0,13	0,49	0,25	0,14	0,24	
15-21. nap	Átlag	3,67	4,13	4,39	5,23	5,66	5,62	4,93	3,77	4,77	
	Szórás	0,55	1,17	0,84	2,22	2,09	2,90	2,55	0,76	1,18	
22-26. nap	Átlag	4,45	4,62	4,16	4,57	5,03	4,31	4,03	3,62	4,59	
	Szórás	1,80	1,13	0,91	1,37	1,89	1,17	0,93	0,35	1,74	
0-26. nap	Átlag	2,94	3,16	3,01	3,04	3,23	3,24	3,00	2,96	3,17	
	Szórás	0,14	0,38	0,28	0,38	0,23	0,32	0,37	0,25	0,17	

A táblázatból adataiból látható, hogy nem volt szignifikáns különbség sem a kontroll- és az egyes kísérleti csoportok között, sem a kísérleti csoportok egymással történő összevetésekor.

A 9. táblázat az alkalmazott dózisokat összevonva egy-egy csoportként mutatja az FA_D- illetve a HA_D-kiegészítés hatását.

9. táblázat. A tápok FA_D- és HA_D-kiegészítésének hatása a patkányok fajlagos takarmány-felhasználására (az FA_D- és HA_D-adatokat dózistól függetlenül összevonva)

		Kontroll	FA _D	HA _D
		Fajlagos takarmány-felhasználás (g/g)		
0-7.nap	Átlag	2,15	2,13	2,21
	Szórás	0,14	0,24	0,20
8-14. nap	Átlag	^a 2,89	^b 2,66	^a 2,78
	Szórás	0,40	0,18	0,32
15-21. nap	Átlag	3,67	4,84	4,77
	Szórás	0,55	1,69	2,07
22-26. nap	Átlag	4,45	4,60	4,16
	Szórás	1,80	1,33	1,19
0-26. nap	Átlag	^a 2,94	^b 3,11	^{ab} 3,09
	Szórás	0,14	0,32	0,30

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns (p<0,05) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

Látható, hogy csak a 8-14. nap között volt eltérés az egyes csoportok között, amely időszakban az FA_D-s csoport fajlagos takarmány-felhasználása szignifikánsan (p<0,05) jobb

volt a kontroll- és a HA_D-kiegészítésű takarmányt fogyasztó csoporténál. A kísérlet teljes időtartamára vonatkoztatva viszont az FA_D már szignifikáns ($p < 0,05$) mértékben rontotta a fajlagos takarmány-felhasználást a kontrollhoz képest.

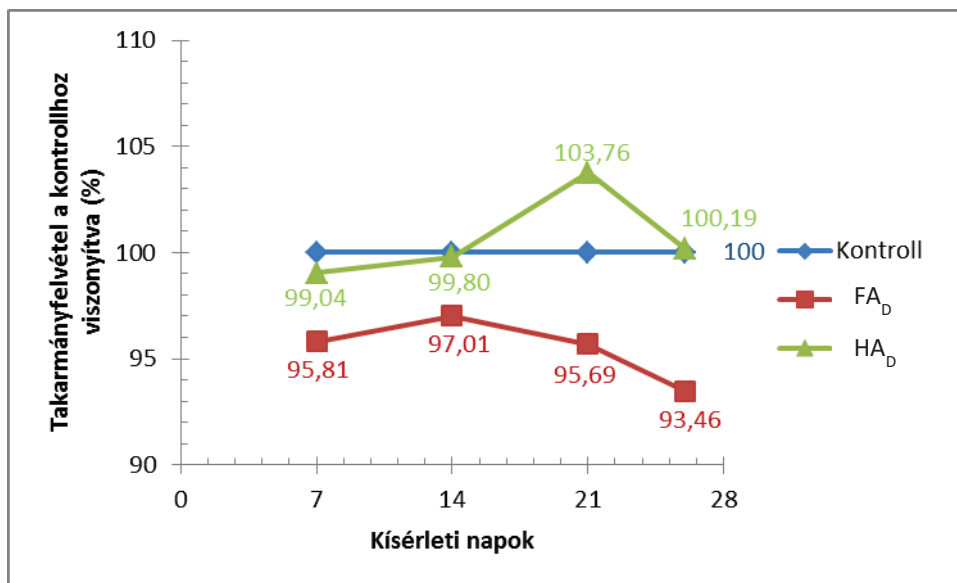
8.1.2. Megbeszélés

Takarmányfelvétel

Mint az a 2. táblázat adataiból látszik, a kísérletben sem a kontrollhoz képest, sem a tesztanyagok egyes dózisaik között nem volt szignifikáns különbség. Ez megerősíti Kocabagli és mtsai. (2002) brojlereken végzett vizsgálatainak eredményeit, miszerint a Farmagülator DryTM humuszanyag-készítmény 2,5 g/kg takarmány dózisban nem változtatta meg szignifikánsan az állatok takarmányfelvételét. Hasonló következtetésre jutottak Yalcin és mtsai. (2006) is, akik szintén a Farmagülator DryTM humuszanyag-készítmény (dózis: 1,5 g/kg takarmány) hatását vizsgálták tojótyúkokon. Ezzel szemben Yasar és mtsai. (2002) ugyanezen terméket, a Kocabagli és mtsai. (2002) által használt adagban (2,5 g/kg takarmány), patkányokon vizsgálva megállapították, hogy a Farmagülator DryTM szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte a takarmányfelvételt. Ivóvízben adagolt formájával (3,5 ml/l Farmagülator LiquidTM) azonban nem tudtak szignifikáns hatást kimutatni.

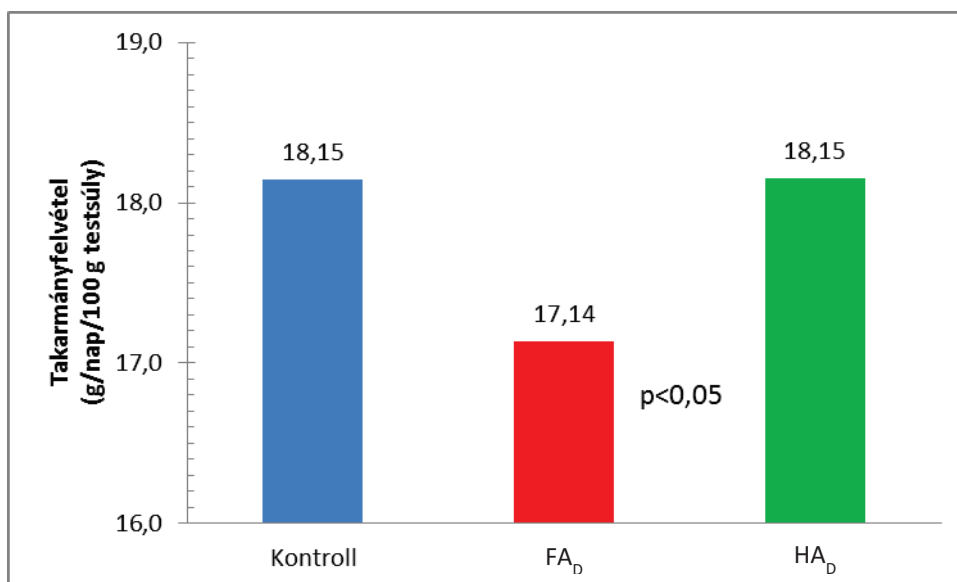
A Karaglou és mtsai. (2004) által tapasztaltak viszont ellentmondanak Yasar és mtsai. (2002), valamint az általam mért eredményeknek is. Ők egy humuszanyag-készítmény hatását vizsgálták brojlercsirkéken dózisingörbét alkalmazva (0, 1, 2, 3 g/kg humuszanyag-kiegészítés a késztakarmányba egy 160 g/kg összhumuszanyag-tartalmú kísérleti anyagból). Azt tapasztalták, hogy a humuszanyagot 1 g/kg takarmány dózisban fogyasztó csoport szignifikánsan ($p < 0,05$) kevesebb takarmányt fogyasztott a kontroll- és a humuszanyagot 2 g/kg adagban fogyasztó csoporthoz képest. További érdekesség, hogy a 3 g/kg takarmány kiegészítést fogyasztó csoport eredménye a kontroll- és a humuszanyagot 1 g/kg takarmány dózisban fogyasztó csoport közé esett, így a kutatók semmiféle dózisösszefüggést nem tudtak megállapítani a takarmányfelvételre vonatkozóan. Ezt támasztják alá saját kísérleti adataim is (2. táblázat).

Az irodalomban található ellentmondások oka feltehetően a humuszanyagok heterogén összetételére, alkalmazásuk módjára (tápban vagy ivóvízben) és idejére, a vizsgálatokban használt eltérő állatfajokra, valamint a különböző tartási körülményekre (laboratóriumi, nagyüzemi stb.) vezethető vissza. Mivel a kísérletben külön és időtengelyben vizsgáltam a humuszanyagok két fő alkotórészének az FA_D-nak és a HA_D-nak a hatását, a kísérleti anyagok dózisainak összevont statisztikai analízise alapján választ kaptam arra a kérdésre, hogy a két anyag azonos vagy különböző képpen befolyásolja a takarmányfelvételt a vizsgálati időintervallumokban (6. ábra).



6. ábra. A takarmányfelvétel relatív változása a kontrollhoz képest, időtengelyben (Kontroll = 100%).

A 6. ábra adataiból következik, hogy az FA_D minden vizsgált időpontban csökkentette a takarmányfelvételt a kontrollhoz képest, míg a HA_D nem befolyásolta tendenciózusan ezt a paramétert.



7. ábra. A teljes kísérleti időszak alapján számított takarmányfelvétel.

Amennyiben a kísérlet teljes időszaka alapján számítjuk a napi takarmányfogyasztást (7. ábra), az eredmények azt támasztják alá, hogy a humuszanyagok két fő alkotója, az FA_D és a HA_D takarmányfelvételre gyakorolt hatása a kontrollhoz képest nem, de egymástól

szignifikánsan ($p < 0,05$) eltér. Az FA_D-kiegészítésben részesült csoportban ugyanis szignifikánsan kisebb volt a takarmányfelvétel, mint a HA_D-tartalmú tápot fogyasztó csoportban. Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy nagy valószínűség szerint az FA_D étvágycsökkentő hatással rendelkezik és/vagy rontja a takarmány ízét.

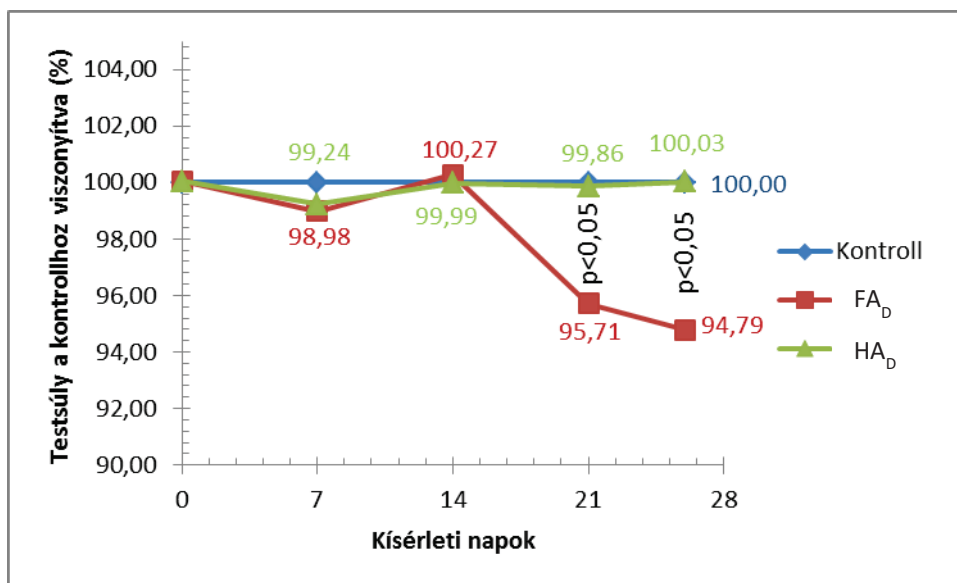
A takarmányfelvétel csökkenésének értékelését célszerű a fajlagos takarmányfelhasználással együtt elvégezni. Amennyiben ugyanis ez utóbbi javul, akár gazdaságosabbá is teheti az állati termék előállítását. A takarmányfelvétel csökkenésének hatásmechanizmusára további vizsgálatok szükségesek.

Testsúly és súlygyarapodás

Mint azt korábban láttuk (4. és 6. táblázat) sem a kontrollhoz képest, sem a tesztanyagok egyes dózisaik között nem volt szignifikáns különbség. Ez a megállapítás érvényes volt a kísérlet egyes szakaszaira és teljes időszakára is. Amennyiben viszont egy-egy csoportba vontuk össze a különböző dózisú FA_D- és HA_D-kiegészítésben részesülő állatok eredményeit (5. és 7. táblázat), úgy már szignifikáns ($p < 0,05$) összefüggéseket kaptunk.

Testsúly

A 8. ábra a kontrollhoz (100%) viszonyítva, időtengelyben szemlélteti az FA_D-nak és a HA_D-nak az állatok relatív testsúlyváltozására kifejtett hatását.



8. Ábra. A dózistól függetlenül egy-egy csoportba összevont kísérleti állatok testsúlyának relatív változása a kontrollhoz (100%) képest, időtengelyben

Az ábra adataiból következik, hogy az FA_D-s kiegészítés azonos mértékben csökkenti az állatok testsúlyát mind a kontroll-, mind a HA_D-s csoporthoz képest. Az FA_D-s és a HA_D-s csoportok közötti különbségek a 21. és 26. napon szignifikánsak ($p < 0,05$).

Kocabagli és mtsai. (2002) brojleren vizsgálták a Farmagülator DryTM humuszanyag-tartalmú takarmányadalék hatását 2,5 g/kg takarmány dózisban. Kísérletükben a kontroll mellett három csoportot állítottak be, amelyek különböző időszakokban kapták a tesztanyagot (0-21. nap között, 22-42. nap között és 0-42. nap között). Azok az állatok, amelyek csak a hizlalás második felében részesültek Farmagülator DryTM-kiegészítésben, szignifikánsan nagyobb testsúlyt értek el a kísérlet végére. A többi esetben a testsúlyra vonatkozóan nem tudtak szignifikáns különbséget kimutatni. Adataim azt támasztják alá, hogy a HA_D nincs szignifikáns hatással az állatok testsúlyára, azaz a 22-42. nap között adagolt Farmagülator DryTM termékkel elért szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobb testsúlyt nem tudjuk megerősíteni. Az ellentmondások oka feltehetően az eltérő állatfajban (brojlercsirke szemben a patkánnyal) és a kísérleti körülményekben (nagyüzemi szemben az intézeti vizsgálattal) rejlik.

Érdekes megvizsgálni az eredményeket Yasar és mtsai. (2002) vizsgálatainak tükrében is. A kutatók két kísérletet végeztek patkányokon folyékony (Farmagülator LiquidTM), illetve por (Farmagülator DryTM) alakú humuszanyagot tartalmazó készítményekkel. Az első kísérletben az állatokat csoportosan tartották (4 állat/ketrec) 20 napon keresztül, a másodikban egyedileg, anyagcsere-ketrecben helyezték el azokat és 10 napos szakaszban vizsgálták a gazdasági mutatókra kifejtett hatást. Az első kísérletben – melyben csoportosan tartották az állatokat – a folyékony termékkel szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobb testsúlyt értek el a kísérlet végére (20. nap), a Farmagülator DryTM etetése viszont nem eredményezett szignifikánsan nagyobb testsúlyt. Ezeknek az eredményeknek ellentmond a második kísérletük, amelyben a Farmagülator LiquidTM termék nem befolyásolta a testsúlyt, ugyanakkor a Farmagülator DryTM kiegészítésű tápot fogyasztó csoportnak a kísérlet végén (10. napon) mért testsúlya szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobb volt a kontrollcsoporténál. A Farmagülator LiquidTM esetében a két kísérletben, a testsúlyban tapasztalt ellentmondás okát a szerzők a kísérletek eltérő időtartamában látják. Állításuk szerint a termék csak hosszabb (20 nap) adagolás alatt fejt ki pozitív hatást a testsúlyra.

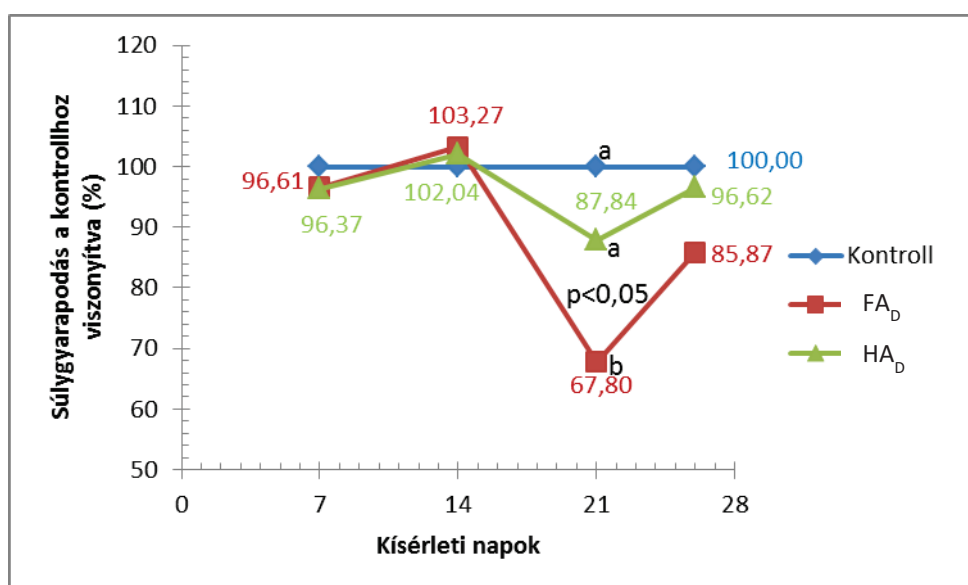
Nyitva marad viszont az a kérdés, hogy a Farmagülator DryTM-termékkel a második kísérletben elért szignifikáns pozitív hatás miért nem volt megállapítható az előző kísérlet első 10 napjában. A fent leírtak alapján látható, hogy az általam tapasztaltak ellentmondásban vannak Yasar és mtsai. fenti adataival. Ez feltehetően arra vezethető vissza, hogy a Farmagülator DryTM illetve a Farmagülator LiquidTM termékek kevert humuszanyag-készítmények, a FA és a HA aránya pedig jelentősen befolyásolhatja az eredményeket. A szerzők munkájukban nem térnek ki az általuk használt termékek FA- illetve HA-tartalmára. Egy másik ok lehet, hogy ovalbuminnal immunizált állatokkal dolgoztam (lásd 8.2. fejezet) és a kísérlet második felében mért intenzív ellenanyag-szintézis ronthatta az eredményeket.

Súlygyarapodás

A kísérlet teljes időtartamára nézve sem az FA_D sem a HA_D nem befolyásolta szignifikánsan a súlygyarapodást (6. és 7. táblázat). Adataim alátámasztják Karaglou és mtsai. (2004) humuszanyagokkal brojlereken végzett kísérletének eredményeit, akik szintén nem tudtak az általuk vizsgált humuszanyag súlygyarapodást javító hatásáról beszámolni.

Adataim ellentmondanak Yalcin és mtsai. (2006) eredményeinek, akik a Farmagülator DryTM humuszanyag hatását vizsgálták (dózis: 1,5 g/kg táp) tojtyúkokban és szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobb súlygyarapodást tapasztaltak. Ugyanakkor felmerül a kérdés, hogy tojtyúk esetén pozitívnak tekinthető-e ez a hatás.

A 9. ábra a kontrollhoz (100%) viszonyítva, idő függvényében mutatja az eredményeket.

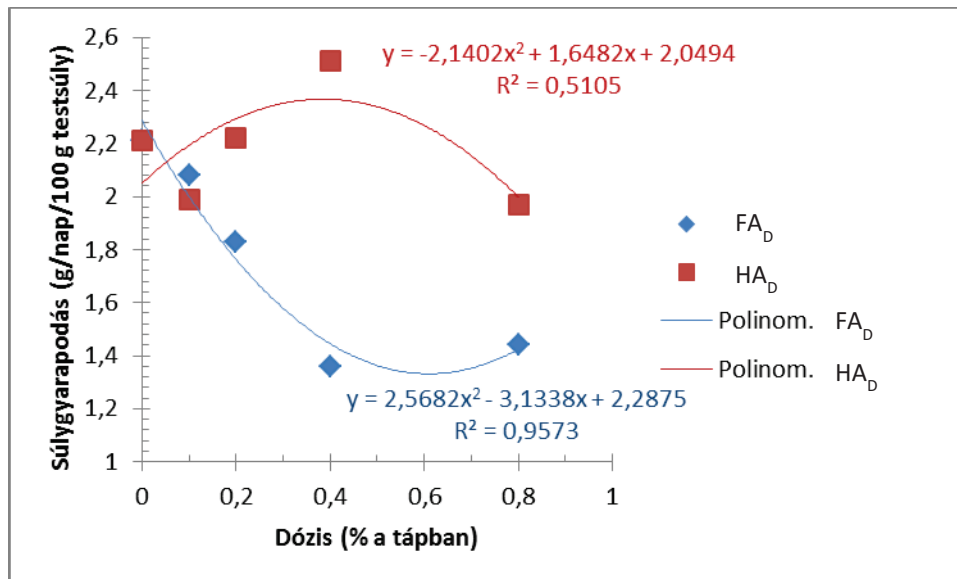


9. ábra. A dózistól függetlenül egy-egy csoportba összevont kísérleti állatok súlygyarapodása a kontrollhoz (100%) képest, időtengelyben

Érdekes a 9. ábrán látható adatokat összevetni a testsúlyfejezetben már említett Yasar és mtsai. (2002) súlygyarapodásra vonatkozó eredményeivel. A kutatók azt tapasztalták, hogy az első kísérletükben a Farmagülator LiquidTM-terméket fogyasztó csoport súlygyarapodása a 0-10. nap között szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobb volt a kontrollcsoporténál, a 11-20. nap között viszont a takarmányban adagolt, por formájú humuszanyagot fogyasztó csoport súlygyarapodása volt szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobb a kontrollénál. Második kísérletükben (10 nap) a Farmagülator DryTM kiegészítésű tápot fogyasztó csoport súlygyarapodása volt szignifikánsan ($p < 0,05$) nagyobb a kontrollcsoporténál.

Az általam mért adatok azt mutatják, hogy a kísérlet első szakaszában (14. napig), igaz nem szignifikáns mértékben, mindkét kísérleti anyag kissé növelte a súlygyarapodást, ami Yasar és mtsai. azon eredményeit látszik alátámasztani, miszerint a humuszanyagoknak lehet pozitív hatása a súlygyarapodásra.

Az ábrán az is látható, hogy a 14-21. nap között mind az FA_D-, mind a HA_D-kezelés vonatkozásában visszaesés tapasztalható a súlygyarapodásban. Ez az FA_D esetében – a kontrollhoz és a HA_D-kiegészítést fogyasztó csoporthoz képest egyaránt – szignifikáns ($p < 0,05$) volt. Érdekes képet mutat, ha megnézzük az FA_D dózisa és a súlygyarapodás közötti összefüggést a kísérlet 3. hetében (10. ábra). Az ábrán látható, hogy az FA_D esetében a dózis igen szoros polinomiális összefüggést mutat ($R^2 = 0,978$) a súlygyarapodással. A HA_D-nál nem mutatható ki ilyen összefüggés.



10. ábra. Az FA_D és a HA_D dóziszfüggő hatása a súlygyarapodásra a 15-21. nap közötti időszakban

Az előző fejezetben (testsúly) már említettem, hogy a kísérletben résztvevő állatokat ovalbuminnal immunizáltam (lásd 8.2. fejezet) és az FA_D esetében igen erős (a kontrollhoz képest 3,5-szeres), a HA_D esetében kevésbé intenzív (a kontrollhoz képest 2,5-szeres) humorális immunstimulációt tapasztaltam. A legjelentősebb mértékben a 0,4% FA_D-t fogyasztó csoport szérumbintáiban emelkedett meg az ellenanyagszint a kísérlet végére. Mivel az immunglobulin-szintézis energia- és aminosavigényes folyamat, logikusnak látszik, hogy az intenzív immunválasz időszakában az FA_D étvágycsökkentő hatása mellett a fent említett tény lehet az oka a súlygyarapodás 3. héten tapasztalt visszaesésének.

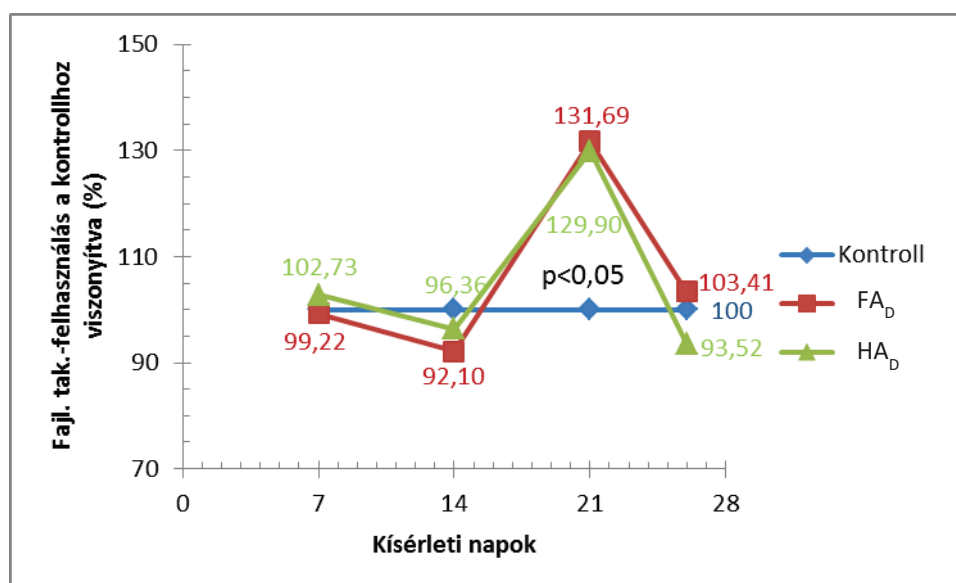
Fajlagos takarmány-felhasználás

Az eredmények elemzése során nem találtam szignifikáns különbséget a különböző kísérleti időintervallumokban az egyes kísérleti csoportok és a kontroll adatai között (8. táblázat). A kísérlet teljes időszakát figyelembe véve sem az FA_D-nak sem a HA_D-nak nem volt kedvező, dózissal összefüggő hatása a fajlagos takarmány-felhasználásra. Az eredmények alátámasztják Kocabagli és mtsai. (2002), Karaglou és mtsai. (2004), valamint Yalcin és mtsai. (2006) eredményeit, akik szintén nem tudtak az általuk használt humuszanyagokkal fajlagos takarmány-felhasználást javító hatást elérni.

Az adatok nem támasztják alá viszont Bailey és mtsai. (1996) eredményeit, akik azt tapasztalták, hogy a Menefee HumateTM humuszanyag-tartalmú takarmány-kiegészítő kakasokban a hizlalás 35. napjáig, jércékben a hizlalás végéig (42 nap) szignifikánsan ($p < 0,05$) javította a fajlagos takarmány-felhasználást.

Yasar és mtsai. (2002) azt tapasztalták, hogy a Farmagülator DryTM humuszanyag-készítmény (dózis: 2,5 g/kg takarmány) szignifikánsan ($p < 0,05$) jobb fajlagos takarmány-felhasználást eredményezett patkányokban, amikor a termék hatását 10 napos időintervallumban vizsgálták.

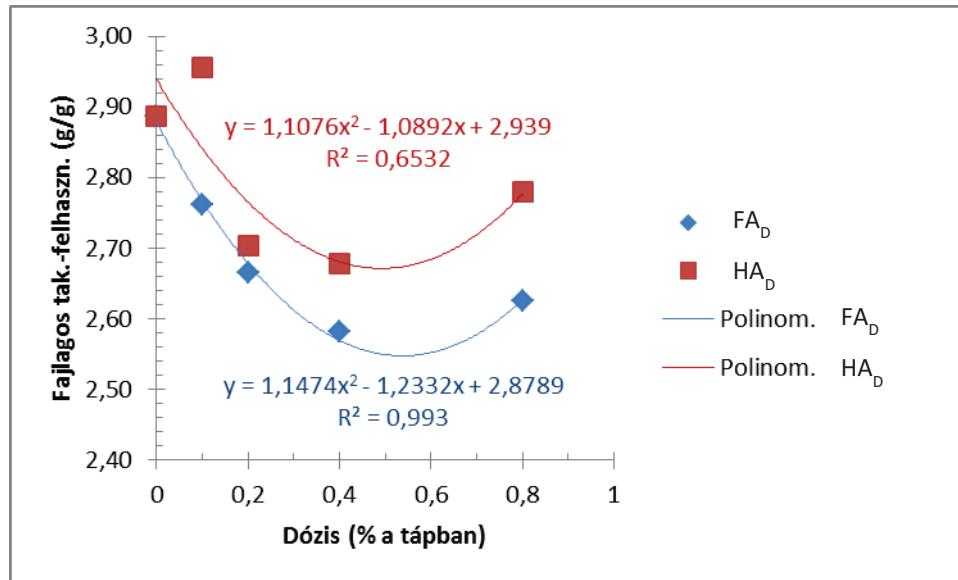
A 11. ábra az FA_D és HA_D kísérletünkben mért, összesített, dózistól független relatív – kontrollhoz (100%) viszonyított – hatását szemlélteti a fajlagos takarmány-felhasználásra.



11. ábra. A kísérleti csoportok fajlagos takarmány-felhasználása a kontrollhoz (100%) képest

A 11. ábrán látható, hogy amennyiben a különböző dózisban FA_D-t és HA_D-t fogyasztó állatok eredményeit egy-egy csoportban összesítjük, és azt időtengelyben vizsgáljuk, úgy azt látjuk, hogy a 14. napon mindkét tesztanyag hatására kedvezőbben alakult a fajlagos takarmány-felhasználás, mint a kontrollcsoportban. Jóllehet a hatás egyik tesztanyag esetében sem volt szignifikáns. Az eredmények alátámasztják Yasar és mtsai. (2002)

megállapítását miszerint a Farmagülator Dry™ humuszanyag-készítmény (dózis: 2,5 g/kg takarmány) szignifikánsan ($p < 0,05$) jobb fajlagos takarmány-felhasználást eredményezett patkányokban.



12. ábra. Fajlagos takarmány-felhasználás a 7-14. nap között.

Amennyiben a kísérlet második hetében a tesztanyagok dózisfüggő hatását is elemezzük, azt látjuk, hogy az FA_D mennyisége és a fajlagos takarmány-felhasználás között igen erős ($R = -0,996$) polinomiális összefüggés van (12. ábra), amely szerint a 0,4%-os FA_D-kiegészítés javította azt a legkifejezettebb mértékben ($p = 0,0539$) a 7-14. nap között a kontrollhoz képest.

Nem szabad viszont elmenni amellett a tény mellett, amelyet már az előző fejezetekben (testsúly, súlygyarapodás) említettünk, nevezetesen, hogy mind az FA_D, mind a HA_D erős immunstimuláns hatással rendelkezik (lásd 8.2. fejezet). Nagy valószínűséggel ez lehet az oka annak, hogy a harmadik héten az FA_D-t és a HA_D-t fogyasztó csoport esetében egyaránt szignifikánsan ($p < 0,05$) rosszabb volt a fajlagos takarmány-felhasználás (11. ábrán). Úgy gondolom, hogy a HA_D esetében a harmadik héten a gazdasági paraméterek közül azért csak a fajlagos takarmány-felhasználásban mutatkozik visszaesés, mert ezen csoport állatai megnövekedett takarmányfelvétellel (lásd 9. ábra) ellensúlyozták az intenzív ellenanyag-szintézis energia- és aminosavigényét.

Az FA_D esetében viszont a takarmányfelvétel enyhe csökkenése mellett a súlygyarapodás nagyobb mértékben, szignifikánsan ($p < 0,05$) romlott, ami az erős humorális immunstimuláns hatással együtt oda vezetett, hogy a kontrollhoz képest, a kísérlet teljes időszakára nézve is, szignifikánsan ($p < 0,05$) rosszabb volt a fajlagos takarmány-felhasználás.

Összefoglalva megállapítható, hogy

- az intézeti körülmények között tartott és ovalbuminnal immunizált SPF patkányokban – a kontrollhoz viszonyítva – sem az FA_D sem a HA_D nem befolyásolta szignifikáns mértékben a takarmányfelvételt, a súlygyarapodást, ellenben az FA_D szignifikáns mértékben rontotta a fajlagos takarmány-felhasználást,
- a HA_D hatása egyik vizsgált paraméterre vonatkozóan sem volt dózisfüggő,
- a kísérlet 7-14. napja között igen erős (R=-0,996) polinomiális összefüggés volt az FA dózisa és a fajlagos takarmány-felhasználás között, mely szerint a 0,4%-os bekeverési szint mutatkozott a legjobbnak,
- az FA_D és a HA_D takarmányfelvételre és testsúlyra kifejtett hatása szignifikánsan eltérő volt, ugyanis a HA_D-kiegészítésben részesült állatok takarmányfelvétele és testsúlya szignifikánsan nagyobb volt, mint az FA_D-s csoportoké.

A kísérlet adatai arra utalnak, hogy a szakirodalomban található, humuszanyagokkal kapcsolatos számos ellentmondás egyik fő oka a vizsgált anyagok eltérő FA:HA-arányában keresendő. Mindezek mellett az alábbi okok játszhatnak még fontos szerepet:

- a kísérletekben használt humuszanyagok különböző dóziszai,
- a vizsgálati anyagok adagolásának időtartama,
- a kísérletekben alkalmazott állatfaj,
- az eltérő környezeti terhelés (főleg intézeti és nagyüzemi vizsgálatok közötti eltérés),
- az immunizálás megléte vagy annak hiánya a tesztanyagok etetésének időszaka (26 nap) alatt.

8.2. A fulvosav és a huminsav hatása a patkányok immunválasz-készségére

8.2.1. Eredmények

Első kísérlet

A 10. és 11. táblázat az FA_D illetve a HA_D hatását mutatja a kísérleti állatok ellenanyag-szintjére.

10. táblázat. A kísérleti csoportok szérumbananyag-szintjének (azon legnagyobb hígítási érték, melynél még pozitív reakció volt kimutatható) átlaga (FA_D)

	Kontroll	FA _D -kiegészítés (%)			
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
	Log 2				
Átlag	^a 12,93	^a 13,52	^a 13,50	^b 15,14	^a 14,39
Szórás	0,53	0,40	0,66	0,46	0,41
	Kontrollhoz viszonyítva (%)				
	100,00	150,50	116,00	464,10	275,90
	Mértani közép				
	7801,70	11737,70	9051,00	36203,90	21526,90

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns (p<0,05) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

11. táblázat. A kísérleti csoportok szérumbananyag-szintjének (azon legnagyobb hígítási érték, melynél még pozitív reakció volt kimutatható) átlaga (HA_D)

	Kontroll	HA _D -kiegészítés (%)			
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
	Log 2				
Átlag	^a 12,93	^a 14,22	^a 14,14	^b 14,77	^a 13,27
Szórás	0,53	0,64	0,50	0,48	0,71
	Kontrollhoz viszonyítva (%)				
	100,00	243,80	232,00	357,80	126,50
	Mértani közép				
	7801,70	19020,70	18101,90	27917,00	9870,10

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns (p<0,05) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

A táblázatok adataiból látszik, hogy a 0,4%-ban alkalmazott FA_D és HA_D egyaránt szignifikánsan (p<0,05) növelte a patkányok szérumbananyag-szintjében az ovalbumin ellen termelődött ellenanyag-szintet.

Második kísérlet

ELISA-vizsgálat

A 12. táblázat az FA_D-nak, illetve a HA_D-nak az állatok ellenanyag szintjére kifejtett hatását mutatja a kísérlet 14. és 26. napján (kísérlet vége).

12. táblázat. A 14. és 26. napon vett szérumminták ellenanyag titer (MK: mértani közép, és a kontrollhoz viszonyítva százalékban megadva)

	14. nap			26. nap		
	Kontroll	FA _D (0,4%)	HA _D (0,4%)	Kontroll	FA _D (0,4%)	HA _D (0,4%)
	400	3200	400	100	25600	800
	800	3200	6400	800	12800	25600
	800	400	800	1600	1600	3200
	1600	800	400	800	400	800
	100	800	400	1600	400	400
	1600	800	3200	200	800	3200
	200	400	800	800	200	800
	1600	6400	12800	100	12800	6400
	1600	800	400	1600	1600	400
		800	400	1600	3200	800
MK	685,8	1131,4	1055,6	544,3	1969,8	1600
%	100	165	153,9	100	361,9	293,9

A táblázat adataiból látható, hogy a 0,4% FA_D és HA_D kiegészítés a kísérlet 14. napjára több, mint 50%-al növelte a szérumban mérhető ellenanyag-koncentrációt. A kísérlet végére (26. nap) a 0,4%-ban alkalmazott FA_D több, mint 2,5-szörösére, a HA_D pedig majdnem 2-szeresére növelte a szérumban mérhető ellenanyag-koncentrációt a kontroll csoporthoz képest.

Limfocitastimulációs vizsgálat

A 13. táblázat az FA_D-nak, illetve HA_D-nak a kísérleti állatok celluláris immunválaszára kifejtett hatását mutatja.

13. táblázat. A 26. napon vett szérumminták limfocitastimulációs tesztjének eredményei

	Kontroll		FA _D		HA _D	
	PHA*	ConA**	PHA	ConA	PHA	ConA
Átlag	2,99	5,02	3,04	5,16	3,13	5,09
Szórás	0,15	0,11	0,12	0,19	0,09	0,11

(* PHA = fitohemagglutinin; ** ConA = konkanavalin A)

A táblázat adataiból kiderül, hogy sem az FA_D sem a HA_D nem befolyásolta a vizsgálat időpontjában az ovalbumin elleni celluláris immunválasz paramétereit.

Szövetteni vizsgálat

A hisztometriai vizsgálatok eredményeit a 14-17. táblázat foglalja össze.

14. táblázat. A duodenum szövetteni és hisztometriai átlageredményei (µm)

Csoport \ Bélszakasz	duodenum		
	a bolyhok átlagos		a hámréteg vastagsága
	hosszúsága	szélessége	
Kontroll	650 ± 50	125 ± 25	30 ± 5
FA _D	650 ± 50	125 ± 25	30 ± 5
HA _D	650 ± 50	125 ± 25	30 ± 5

15. táblázat. A jejunum szövetteni és hisztometriai átlageredményei (µm)

Csoport \ Bélszakasz	jejunum		
	a bolyhok átlagos		a hámréteg vastagsága
	hosszúsága	szélessége	
Kontroll	250 ± 50	125 ± 25	25 ± 3
FA _D	250 ± 50	125 ± 25	25 ± 3
HA _D	250 ± 50	125 ± 25	25 ± 3

16. táblázat. Az ileum szövetteni és hisztometriai átlageredményei (µm)

Csoport \ Bélszakasz	ileum		
	a bolyhok átlagos		a hámréteg vastagsága
	hosszúsága	szélessége	
Kontroll	350 ± 50	120 ± 20	30 ± 5
FA _D	350 ± 50	120 ± 20	30 ± 5
HA _D	350 ± 50	120 ± 20	30 ± 5

A 14., 15. és 16. táblázat adataiból kiderül, hogy nem volt eltérés a bélnyálkahártyát borító hámsejtek, a kehelysejtek vagy a kötőszöveti rétegek (stratum villosum, propria, submucosa) szöveti képében. Az ileumban, a metszési sík függvényében is fellelhető limfoid folliculusok hiperpláziáját (a limfoblasztsejtekből felépülő centrum germinatívumok átlagos átmérője) lehetett látni. A FA_D-val vagy HA_D-val kezelt állatok esetében a limfoid képletek mérete lényegesen meghaladta (800-900 µm) a kontrollnál mért értéket (300-400 µm).

17. táblázat. A lép minták szövettani és hisztometriai átlageredményei (µm)

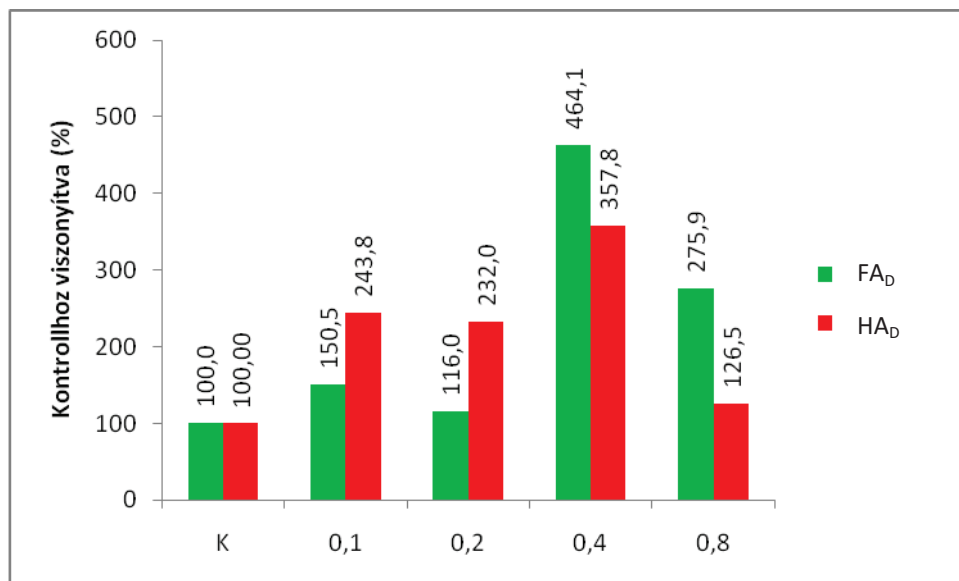
Csoport \ Sejtzóna	Periarteriolaris („T”-dependens) limfoid sejtzóna	Marginalis („B”-dependens) limfoid sejtzóna	Centrum germinatívum („B”-dependens)
FA _D	125 ± 25	175 ± 25	+
HA _D	125 ± 25	175 ± 25	+
Kontroll	125 ± 25	110 ± 10	-

A táblázat adataiból kiderül, hogy az FA_D-val és HA_D-val kezelt patkányok lépében a marginális („B”-dependens) limfoblastokból felépülő limfoid sejtzóna átlagos vastagsága 150-200 µm-re növekedett a kontroll (100-120 µm) méreteihez képest. A kísérleti csoportokban – a kontrollhoz képest – lényegesen nagyobb átmérőjű centrum germinatívumokat lehetett felismerni. A periarteriolaris („T”-dependens), kis limfocitákból felépülő zónaméretében nem tapasztaltunk eltérést a kontrollhoz képest.

8.2.2. Megbeszélés

Első kísérlet

A 13. ábráról (amely a különböző kísérleti csoportok azon szérumhígítási átlagát mutatja, ahol azok még pozitív reakciót adtak az ELISA-lemezekre felkötött, standard mennyiségű antigénnel) leolvasható, hogy mind az FA_D-val, mind a HA_D-val kiegészített tápot fogyasztó állatok ellenanyagtitere nagyobb a kontrollcsoporténál. Az eredmények tükrében kijelenthető, hogy 0,4%-os dózisban mind az FA_D-s, mind a HA_D-s kiegészítés szignifikánsan ($p < 0,05$) javítja a humorális immunválasz intenzitását (10. és 11. táblázat).



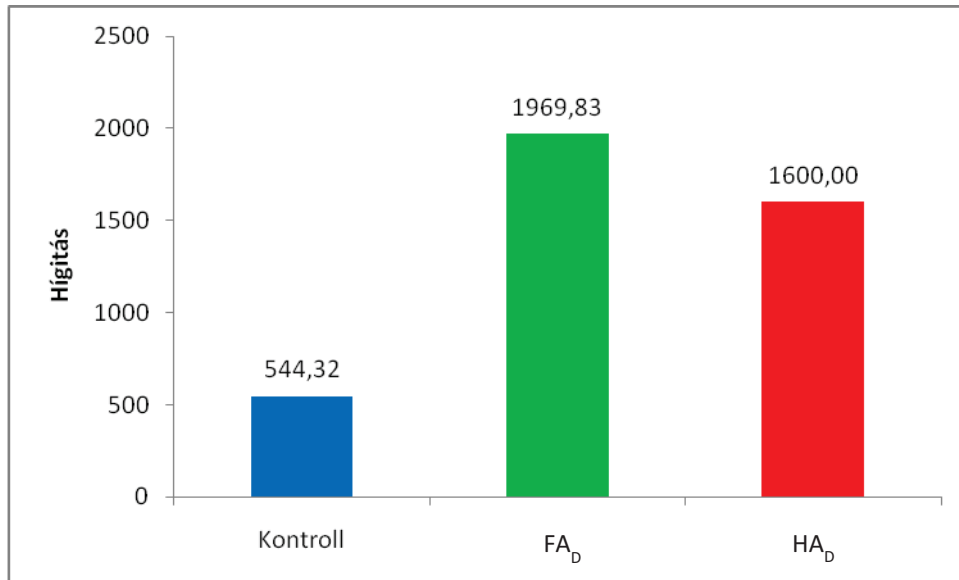
13. ábra. A kísérleti csoportok szérumhígítási átlaga a kontrollhoz viszonyítva (kontroll = 100%)

A vizsgálati anyagok 0,4%-os koncentrációban növelték legnagyobb mértékben az ellenanyag szintézist. Megállapítható az is, hogy az FA_D – az immunstimuláció szempontjából optimális dózisban (0,4%) adagolva – erősebb hatású az azonos koncentrációban adott HA_D-nál. Ez a tény esetleg összefüggésben lehet a két frakció egyes molekuláinak különbözőségével, ugyanis az FA-molekulák esetében egységnyi tömegre több és különböző reaktív funkciócsoport esik (Islam és mtsai, 2005).

Második kísérlet

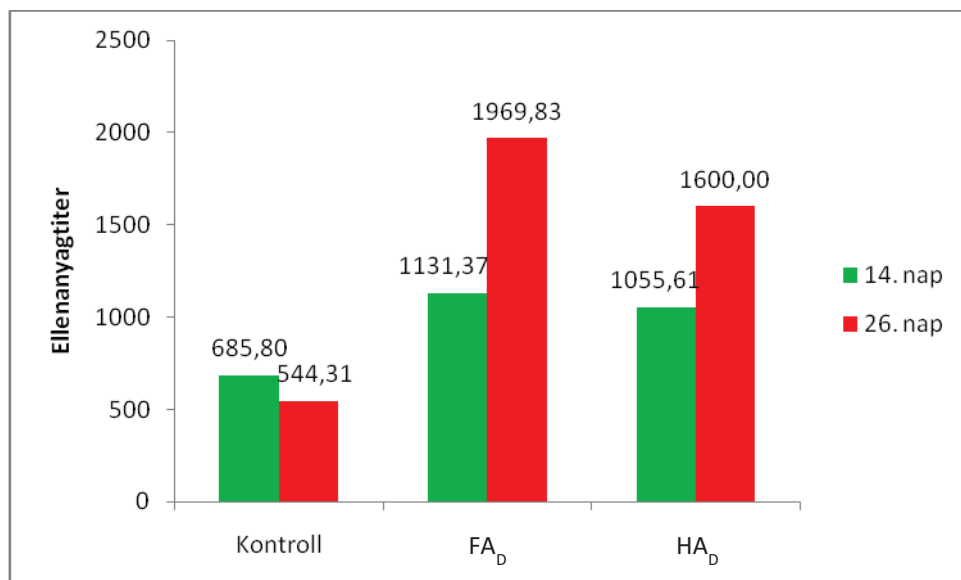
ELISA-vizsgálat

A második kísérletben, az előző vizsgálatban az immunizálás szempontjából optimálisnak talált dózist (0,4% FA_D és HA_D) alkalmaztam. Az eredmények alátámasztják az első kísérletben mért immunstimuláns hatást (14. ábra).



14. ábra. A szérumminták hígításainak mértani középértéke a kísérlet végén

A 15. ábra a kísérletben résztvevő csoportok immunválaszának időbeli változását mutatja.



15. ábra. A szérumminták hígításainak mértani átlaga a 14. és a 26. napon

Az ábrán látható, hogy a 26. napra a kontrollcsoport immuntiter átlaga már hanyatlak a 14. napi értékhez képest (-20,63%), míg a kísérleti csoportok esetében az immuntiter átlaga jelentős növekedést mutat (kontroll 100%; FA_D 174,11%; HA_D 151,57%).

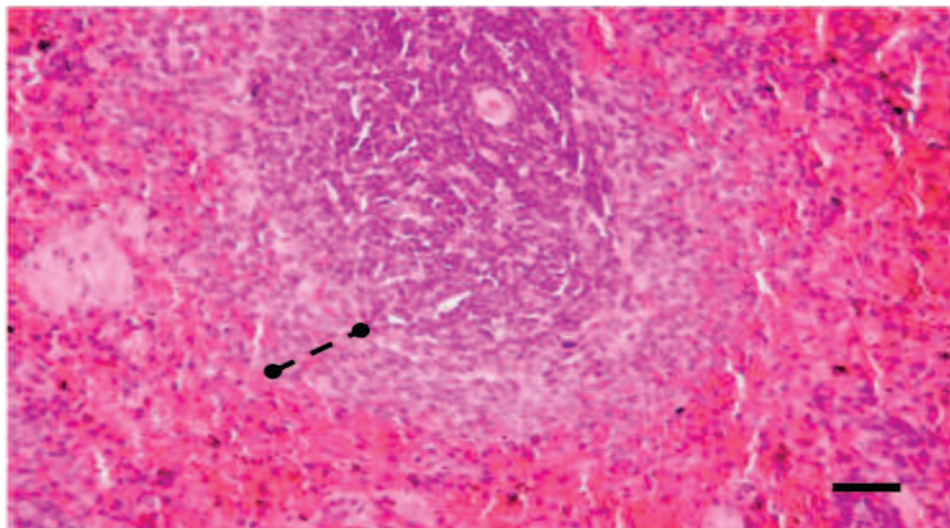
Az első és második kísérlet ELISA-eredményei alapján kijelenthető, hogy a humorális immunstimuláció szempontjából az FA_D és a HA_D optimális dózisa 0,4%. A kísérleti anyagok jelentősen megnövelték az immunválasz időtartamát is a kontrollhoz képest (15. ábra).

Limfocitastimulációs vizsgálat

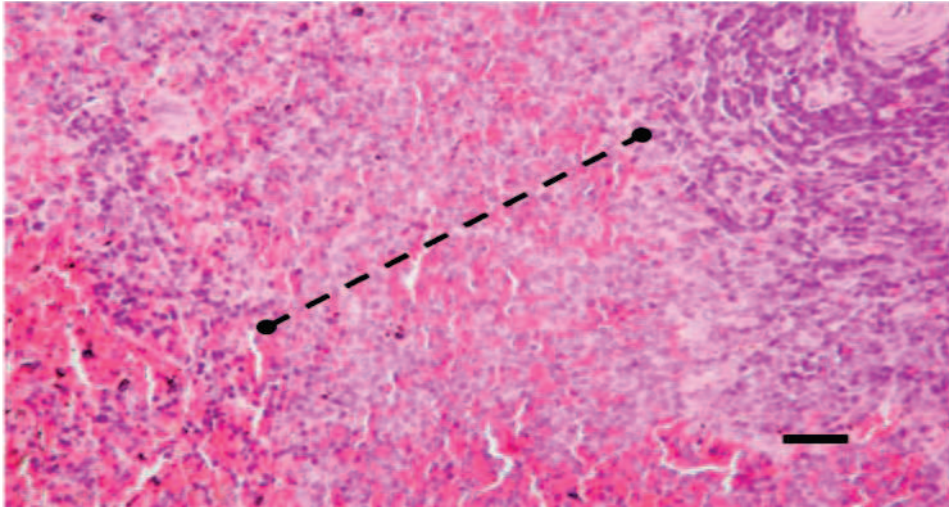
Vizsgáltam az FA_D és a HA_D celluláris immunválaszra kifejtett hatását is. A szakirodalomban Jooné és mtsai. (2002) írják le, hogy az FA-ban gazdag oxihumát serkenti a phytohaemagglutininel (PHA) stimulált limfociták proliferációját. A kísérleti adatok alapján Jooné és mtsai. (2002) eredményeit nem tudom megerősíteni, mivel az általam vizsgált dózisban (0,4%) és időpontokban sem az FA_D sem a HA_D esetében nem találtam a kontrollcsoporténál erősebb celluláris immunstimulációt. Az ellentmondás oka valószínűleg abban keresendő, hogy a kutatók az immunizálást követő 14. napon, én pedig a 24. napon vizsgáltam a celluláris immunválaszt.

Szövetteni vizsgálat

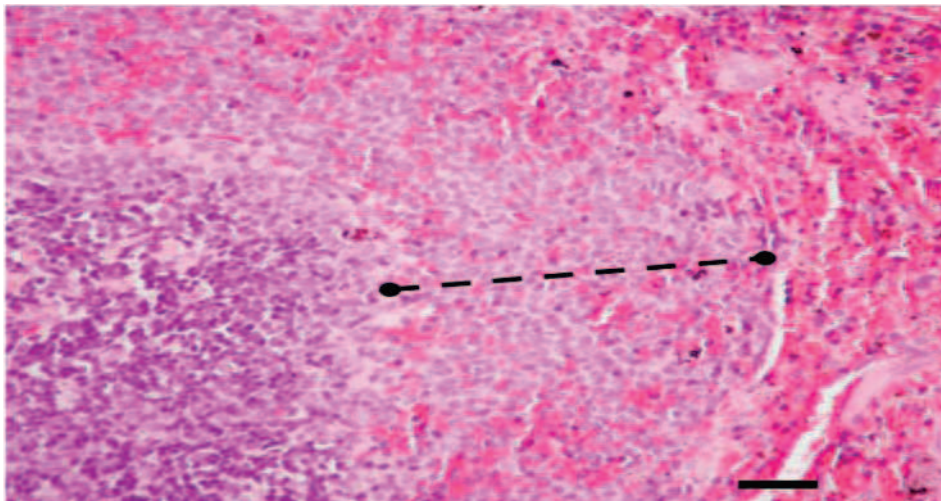
A 0,4% FA_D- és HA_D-tartalmú tápokkal, 26 napon át etetett patkányok lépének fehérpulpájában a marginális (limfoblasztokból felépülő „B”-dependens) zónák átlagosan 150-200 µm vastagságúra növekedtek a kontroll 100-120 µm-es értékéhez képest. Ezen túlmenően limfoblaszt-proliferációt mutató centrum germinatívumok jelentek meg, amelyek kifejezett humorális immunstimuláns hatásra utalnak (1-3. kép).



**1. kép. A lép szövettani képe (kontrollcsoport). Vékony marginális zóna a lép fehér pulpájában.
HE, lépték (bar): 50 µm**

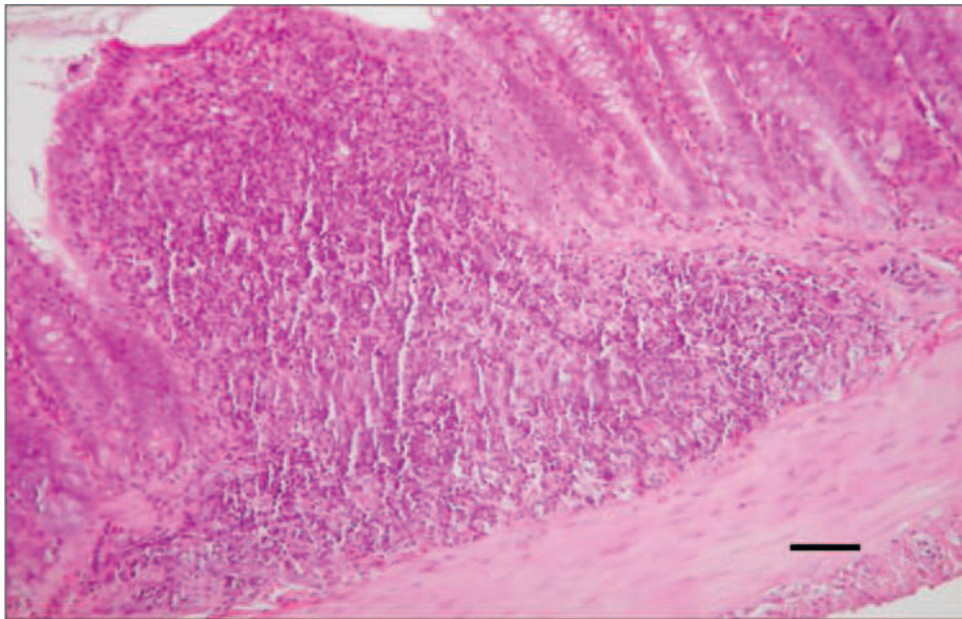


2. kép. A lép szövettani képe (FA_D-kiegészítést fogyasztó csoport). A marginális zóna megvastagodott a kontrollcsoportéhoz képest. HE, lépték (bar): 50 μm

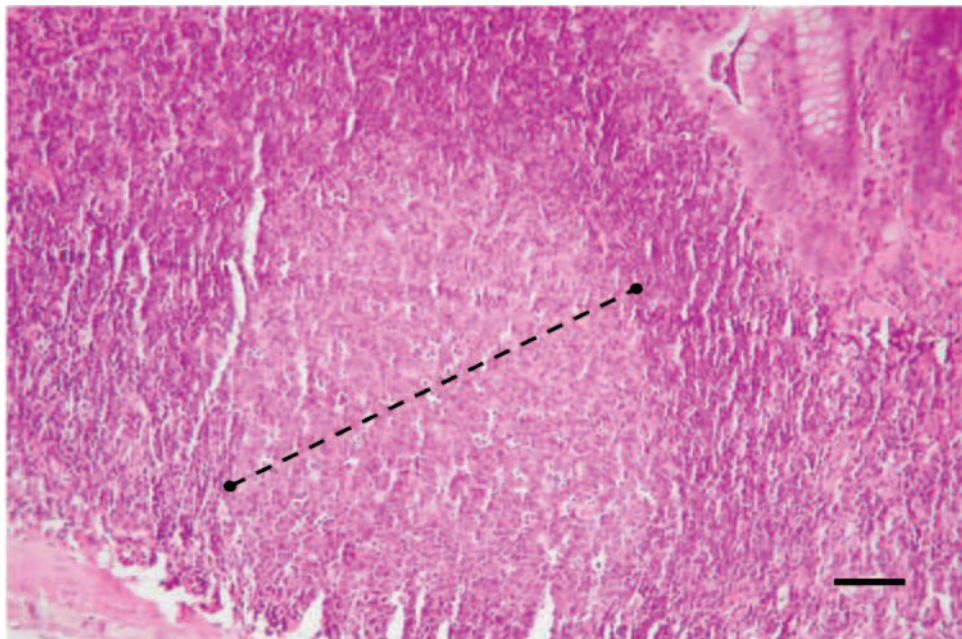


3. kép. A lép szövettani képe (HA_D-kiegészítést fogyasztó csoport). A marginális zóna megvastagodott a kontrollcsoportéhoz képest. HE, lépték (bar): 50 μm

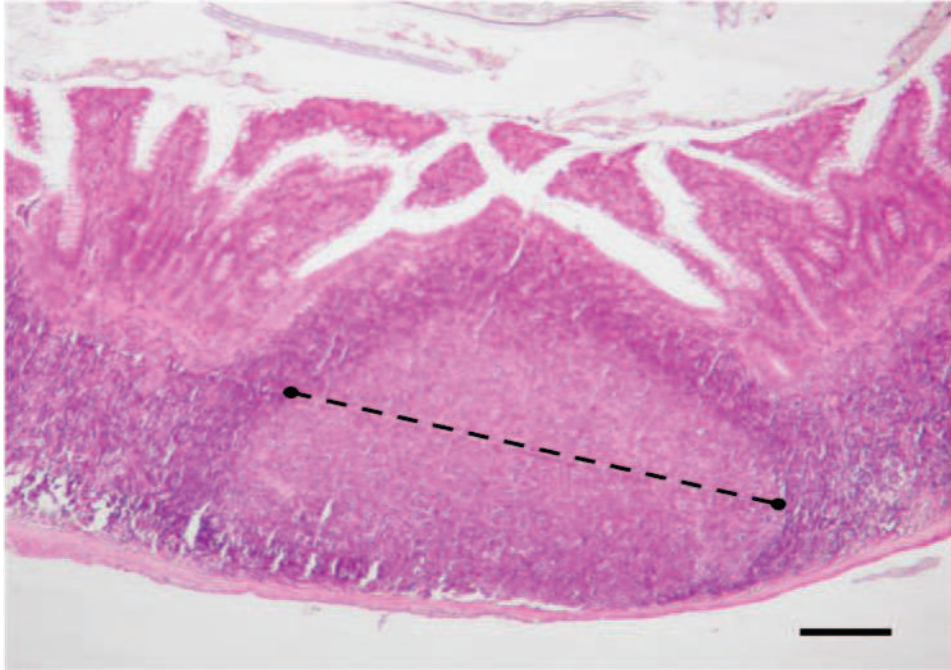
A csípőbélfal submucosa rétegében helyeződő limfoid folliculusok limfoblastokból felépülő centrum germinatívuma ugyancsak megnövekedett (800-900 μm átmérőjűre) a kezeletlen kontrollhoz (300-400 μm átmérő) képest, ami szintén az FA_D és a HA_D humorális immunstimuláns hatását bizonyítja (4-6. kép).



4. kép. A csipőbél szövettani képe (kontrollcsoport). Normális szövettani képű nyiroktüsző. HE, lépték (bar): 75 μ m



5. kép. A csipőbél szövettani képe (FA_D-kiegészítést fogyasztó csoport). Megnövekedett, centrum germinativumot tartalmazó nyiroktüsző. HE, lépték (bar): 75 μ m



6. kép. A csipőbél szövettani képe (HA_D-kiegészítést fogyasztó csoport). Megnövekedett, centrum germinativumot tartalmazó nyiroktüsző. HE, lépték (bar): 100 µm

Összefoglalva megállapítható, hogy

- mind az FA_D mind a HA_D kifejezett immunstimuláns hatással rendelkezik,
- az ovalbumin ellen adott humorális immunválasz szempontjából a 0,4%-os FA_D- és HA_D-kiegészítés tekinthető az optimális koncentrációnak,
- Az FA_D és a HA_D egyaránt a humorális immunválaszt serkenti.

Az FA_D és a HA_D immunstimuláns hatása a gyakorlati takarmányozás számára igen nagy jelentőséggel bírhat, hiszen patogénterhelésnek kitett állományokban a humuszanyagok erős humorális immunstimuláns hatása hozamnövekedést is eredményezhet. Feltehetően erre vezethető vissza azok szakirodalomban közölt (Parks, 1988; Bailey és mtsai., 1996; Eren és mtsai., 2000; Kocabagli és mtsai., 2002), nagyüzemi kísérletekben mért hozamfokozó hatása.

8.3. A fulvosav és a huminsav hatása a bélflórára és egyes alkotóira (*in vivo* és *in vitro*)

8.3.1. Eredmények

A 18. táblázat az állatok vastagbél tartalmában lévő, különböző baktériumcsoportok csíraszámát szemlélteti az első kísérlet 26. napján.

18. táblázat. A vastagbélflóra alakulása a különböző koncentrációban FA_D-t, illetve HA_D-t tartalmazó táppal etetett patkányokban (n.é.= nem értékelhető)

	Kontroll		FA _D -kiegészítés (%)		
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
Tejsavtermelő baktériumok	3,60x10 ⁸	4,12x10 ⁸	n.é.	5,64x10 ⁸	6,17x10 ⁸
Coliformok	3,06x10 ⁷	6,98x10 ⁷	4,38x10 ⁷	8,16x10 ⁷	2,10x10 ⁷
Anaerob rothasztók	2,7x10 ⁴	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²
	Kontroll		HA _D -kiegészítés (%)		
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
Tejsavtermelő baktériumok	3,60x10 ⁸	4,80x10 ⁸	4,16x10 ⁸	1,68x10 ⁸	9,02x10 ⁸
Coliformok	3,06x10 ⁷	2,92x10 ⁷	2,32x10 ⁷	1,54x10 ⁷	8,84x10 ⁷
Anaerob rothasztók	2,7x10 ⁴	<10 ²	<10 ²	<10 ²	<10 ²

A táblázat adataiból látható, hogy a tejsavtermelők és a coliformok tekintetében nincsenek nagyságrendi különbségek sem a kontroll és a kísérleti csoportok, sem pedig a tesztanyagok között (a tejsavtermelők száma minden csoportban 10⁸ CFU/g nagyságrendű, a coliformok nagyságrendje pedig 10⁷ CFU/g).

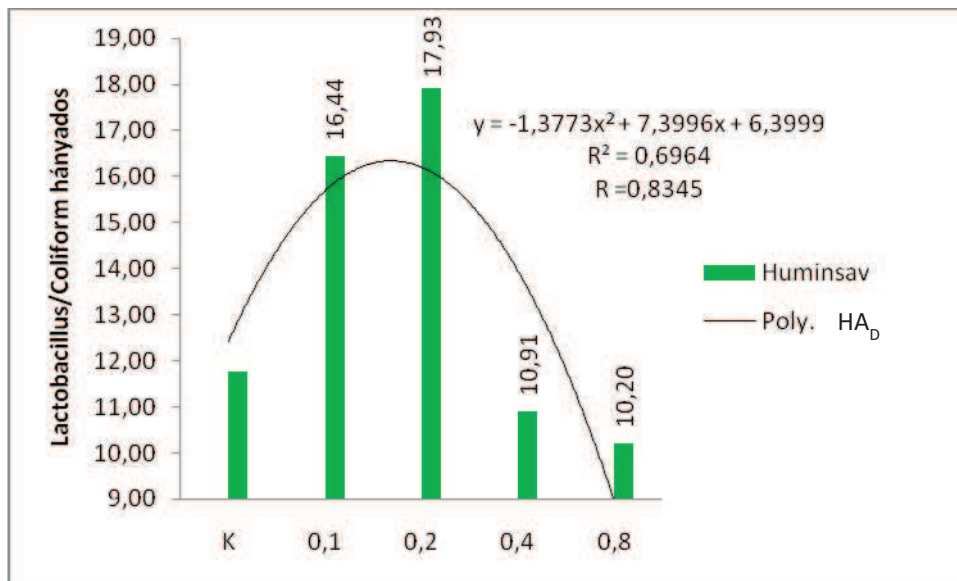
Mindkét humuszanyag-kiegészítésű rendszerben a kimutatási határ (10² CFU/g) alá csökkent a szulfitredukáló anaerob csírák száma, amely a kontrollhoz képest több mint 2 nagyságrendű bélflóra-eltolódást jelent.

8.3.2. Megbeszélés

A bélmikroflóra mikroökológiai rendszert alkot az egyes bélszakaszokban, amely annál előnyösebb a gazdaszervezet számára, minél nagyobb a főflóra elemeinek a kísérő és a maradványflórához viszonyított aránya (Gedek, 1989).

Vizsgálati eredmények alapján mind az FA_D, mind a HA_D kedvezően befolyásolta a vastagbélflóra egyensúlyát, mivel – a kontrollhoz képest – két kiegészítővel csökkentette a maradványflórához tartozó, szulfitredukáló anaerob csírák számát.

A 18. táblázat adatai alapján számszerűen is kifejezhető az egyes dózisokra vonatkozó tejsavtermelő/coliform arány. Ennek megfelelően a 15. ábra a HA_D tejsavtermelő/coliform-hányadosra kifejtett hatását szemlélteti.



15. ábra. A HA_D hatása a tejsavtermelő/coliform-hányadosra

Az FA_D esetében ezek az arányszámok nem mutattak dózishatásra utaló összefüggést, ugyanakkor a kísérlet 26. napján a HA_D-kiegészítés mértéke és a tejsavtermelő/coliform-arány között polinomiális korreláció (R=0,834) valószínűsíthető.

Összefoglalva megállapítható, hogy

- mind az FA_D, mind a HA_D kedvezően befolyásolta a vastagbélflóra egyensúlyát, mivel – a kontrollhoz képest – két kitevővel csökkentette a maradványflórához tartozó szulfitredukáló anaerob csírák számát,
- a HA_D-tartalmú táp kedvezően módosította a bélflóra egyensúlyi állapotát azáltal, hogy növelte a tejsavtermelő/coliform-arányt,
- a HA_D-tartalmú tápnak a tejsavtermelő/coliform arányára kifejtett hatása dóziszfüggő, e tekintetben a 0,2%-os koncentráció bizonyult a legkedvezőbbnek.

8.4. A fulvosav és a huminsav hatása a vérplazma vasredukációs képességére (FRAP) és az AST aktivitására

8.4.1. Eredmények

FRAP, AST

A minták FRAP- és AST-meghatározásának eredményeit a 19. és 20. táblázatok szemléltetik.

19. táblázat. Az FA_D hatása a plazma FRAP-koncentrációjára és az AST aktivitására

	Kontroll	FA _D -kiegészítés (%)			
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
	FRAP (μmol/l)				
Átlag	819,20	969,50	914,50	968,13	909,13
Szórás	365,31	482,94	353,75	292,96	435,84
%	100,00	118,35	111,63	118,18	110,98
	AST (U/l)				
Átlag	167,43	212,25	210,38	196,50	207,50
Szórás	17,78	80,42	65,47	45,96	69,94
%	100,00	126,77	125,65	117,36	123,93

20. táblázat. A HA_D hatása a plazma FRAP-koncentrációjára és az AST aktivitására

	Kontroll	HA _D -kiegészítés (%)			
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
	FRAP (μmol/l)				
Átlag	819,20	757,63	991,25	1050,25	850,00
Szórás	365,31	301,12	381,57	360,16	290,45
%	100,00	92,48	121,00	128,20	103,76
	AST (U/l)				
Átlag	167,43	179,13	199,88	210,25	191,88
Szórás	17,78	45,63	62,67	89,66	73,54
%	100,00	106,99	119,38	125,57	114,60

A táblázatok adataiból látható, hogy az FA_D és a HA nem befolyásolta szignifikáns mértékben a patkányok vérében mérhető vasredukációs képességet és AST-aktivitást.

A kezelt és a kontrollpatkányok májának szöveti képében nem volt eltérés.

8.4.2. Megbeszélés

A rendelkezésemre álló irodalom adatai szerint az egészséges, hím, Wistar patkányok vérplazmájában mérhető vasredukációs képesség – azaz a FRAP-érték – 200-1100 $\mu\text{mol/l}$ között változik (Hadipour és mtsai., 2003; Nakhaee és mtsai., 2009; Karasová és mtsai., 2012).

A humuszanyagok elektrondonorként és -akceptorként is részt vehetnek az oxidoredukációs folyamatokban. Az élő szervezetben uralkodó elektrokémiai viszonyok között főleg a redukáló tulajdonságuk játszik fontos szerepet (Ho és mtsai., 2002). Ismeretes, hogy az FA igen jól, a HA pedig – molekulatömegtől függően – eltérő mértékben szívódhat fel a bélcsatornából. Shinozuka (2003) vizsgálatai alapján az FA és HA molekulatömege attól függ, hogy a kiindulási anyag a szénülési folyamat mely fázisában van (pl.: folyóüledék, tőzeg, lignin, stb). Mivel a kísérletek során Dudaritból (lignin) származó FA_D-val, és HA_D-val dolgoztam valószínűsíthető, hogy mindkét vizsgálati anyag jelentős mennyiségben szívódott fel az emésztőcsatornából. Ezt indirekt módon a mikroelemekkel végzett vizsgálataink is alátámasztják (6.6. fejezet).

Az előzőekben leírtak alapján azt vártam, hogy az FA_D, illetve HA_D alkalmazása növeli a szervezet vasredukációs kapacitását. Ezzel szemben az eredmények azt mutatják, hogy a vizsgálati anyagok egyik alkalmazott dózisban sem befolyásolták szignifikánsan a FRAP-értéket.

Az AST (aszpartát transzamináz) a transzamináz enzimek csoportjába tartozik. Az aminocsoportot tudja áthelyezni meghatározott aminosavról másik karbonsavra, amiből így aminosav keletkezik. A vérben mért mennyisége azért fontos, mert szintjének emelkedése májkárosodásra utalhat.

A szakirodalomban a humuszanyagok májra kifejtett hatásáról egymásnak ellentmondó közlemények találhatók. Míg Béres (1957), Masilinski és mtsai. (1993), valamint Lotosh (1991) májvédő hatásról számol be, addig Ho és mtsai. (2002) azt találták, hogy a HA felszabadítja a májban a ferritinből a vasat, ami a megnövekedett lipidperoxidáción keresztül májkárosító hatású lehet. Adataink alapján a kérdést nem tudjuk egyértelműen megválaszolni. Azt látjuk ugyanis, hogy a kontrollhoz képest mindegyik csoportban nagyobb volt a vérben mért AST-aktivitás, ugyanakkor a kontrolltól való eltérés egyik csoportban sem érte el a szignifikáns ($p < 0,05$) szintet (20. táblázat).

Az FA_D-val vagy HA_D-val kezelt, valamint a kontrollcsoport egyedeiben a máj metszeteiben nem mutatkozott kóros elváltozás, azok szöveti képe nem tért el egymástól. A vizsgálat alapján azt mondhatjuk tehát, hogy sem az FA_D sem a HA_D nem befolyásolta szignifikáns mértékben a máj állapotát.

Összefoglalva megállapítható, hogy

- sem az FA_D sem a HA_D nem változtatta meg a vérplazma összantioxidáns-kapacitását,
- az AST adatai és a szövettani vizsgálat alapján a tesztanyagoknak nem volt májkárosító hatásuk,
- egyik vizsgált paraméter esetében sem volt dóziszfüggő hatás, ami arra utal, hogy az FA_D és a HA_D a 0,1-0,8%-os tartományban alkalmazva a tápokban, e tekintetben biztonságosnak tekinthetők.

8.5. A fulvosav és a huminsav hatása a pajzsmirigy működésére

8.5.1. Eredmények

A 21. és 22. táblázat az FA_D és a HA_D hatását szemlélteti a vérplazma TSH-, T3- és T4-koncentrációjára, valamint a T4/T3-hányadosra.

21. táblázat. Az FA_D hatása a vérplazma TSH-, T3- és T4-koncentrációjára, valamint a T4/T3-hányadosra

	Kontroll	FA _D -kiegészítés (%)			
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
	TSH (nmol/l)				
Átlag	4,09	4,75	5,79	5,50	6,31
Szórás	1,24	1,75	2,04	1,05	2,93
	T4 (nmol/l)				
Átlag	80,88	79,68	83,58	68,44	68,72
Szórás	15,56	16,36	15,25	14,60	17,49
	T3 (nmol/l)				
Átlag	2,18	2,12	2,39	2,05	2,17
Szórás	0,27	0,22	0,26	0,25	0,13
	T4/T3				
Átlag	37,06	37,53	35,06	33,62	31,64
Szórás	5,43	5,40	5,74	7,37	7,94

22. táblázat. A HA_D hatása a vérplazma TSH-, T3- és T4-koncentrációjára, valamint a T4/T3-hányadosra

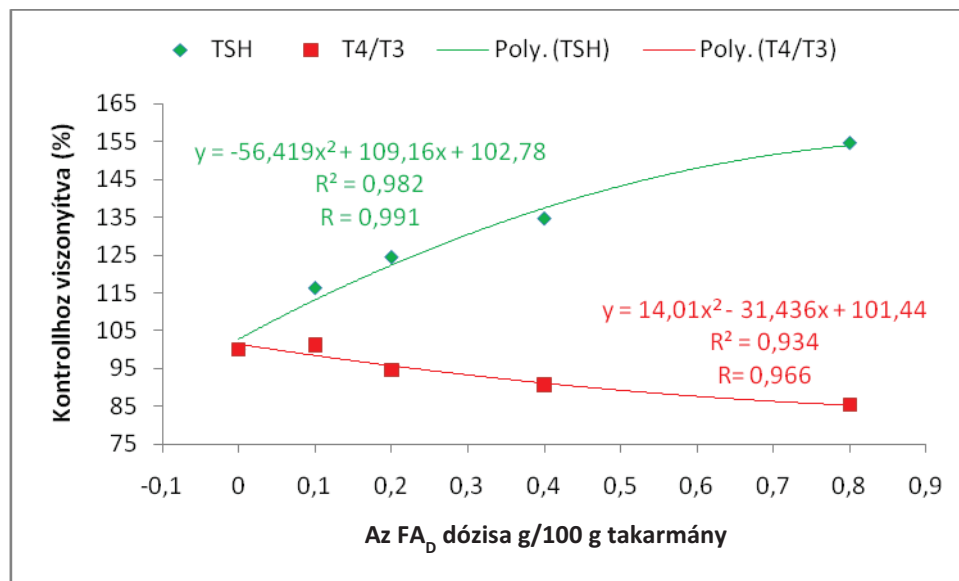
	Kontroll	HA _D -kiegészítés (%)			
	0	0,1	0,2	0,4	0,8
	TSH (nmol/l)				
Átlag	4,09	5,50	5,19	3,33	3,72
Szórás	1,24	2,26	1,44	1,00	0,41
	T4 (nmol/l)				
Átlag	80,88	72,39	92,49	95,14	80,83
Szórás	15,56	13,41	18,44	3,65	15,46
	T3 (nmol/l)				
Átlag	2,18	2,19	2,36	2,41	2,35
Szórás	0,27	0,07	0,53	0,29	0,47
	T4/T3				
Átlag	37,06	33,40	39,83	37,87	35,76
Szórás	5,43	4,99	6,98	2,51	10,24

A táblázatok adataiból megállapítható, hogy sem az FA_D, sem a HA_D nem befolyásolta szignifikáns mértékben a vérplazma TSH-, T₃- és T₄-koncentrációját, valamint a T₄/T₃-hányadost, bár az FA_D esetében a TSH-koncentráció a dózissal szignifikáns korrelációban növekedett, a T₄/T₃-hányados pedig csökkent. A HA_D esetében nem találtam hasonló tendenciát egyik vizsgálati paraméter esetében sem.

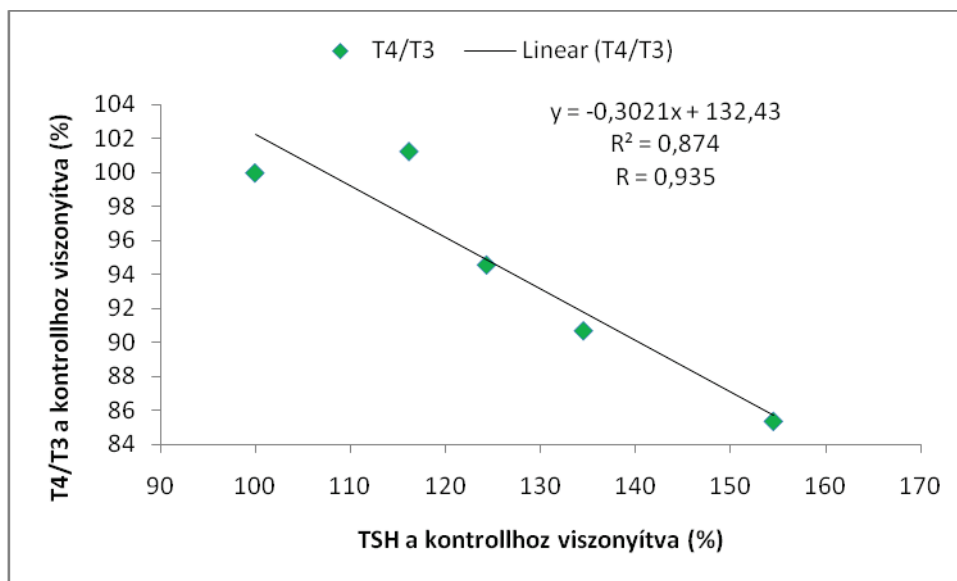
8.5.2. Megbeszélés

A humuszanyagoknak (FA, HA) a szakirodalomban is közölt egyik nemkívánatos hatása a pajzsmirigy csökkent működésében nyilvánul meg (Delange, 1988; Huang és Fung, 1991; Huang és mtsai., 1994; Herzig és mtsai., 2000).

A kísérletünkben az FA_D-kiegészítés alkalmazott dózisa igen szoros pozitív korrelációban (R=0,991) voltak a vérplazma TSH-koncentrációjával, és negatívban a T₄/T₃-hányadossal (R=-0,966), ami arra utal, hogy az FA_D mennyiségének emelkedésével egységnyi T₃-ra egyre kevesebb T₄ jutott (16. ábra).



16. ábra. Az FA_D dóziszfüggő hatása a vérplazma TSH-koncentrációjára és a T₄/T₃-hányadosra a kontrollhoz (100%) viszonyítva



17. ábra. A vérplazma TSH-koncentrációja és a T_4/T_3 -hányados közötti korreláció a kontrollhoz (100%) viszonyítva

Alapjában véve a növekvő TSH-koncentráció jelzi a szubklinikai hipotireoid állapot és az FA_D dózisa közötti összefüggést (16. ábra).

Az FA_D alkalmazása esetében a plazmában mérhető TSH-koncentráció és a T_4/T_3 -hányados között kifejezett lineáris negatív korreláció ($R = -0,93$) volt, ami a fentebb leírt megállapításból is egyenesen következik (17. ábra). Ezt az állapotot a szervezet a T_4 periférián történő T_3 -má való nagyobb arányú átalakításával próbálja ellensúlyozni, ami a T_4/T_3 -hányadosnak az FA_D emelkedő mennyiségével összefüggő csökkenésében jut kifejezésre (16. ábra).

Huang és mtsai. (1991) *in vitro* vizsgálatai szerint a humuszanyagok jódmegkötőképességét többek között azok koncentrációja befolyásolja. Kísérletünk igazolta, hogy az FA_D esetében *in vivo* is érvényes a koncentrációfüggő hatás. A szerzők szerint a jód megkötésében még az oxidoredukciós folyamatoknak van jelentős szerepe. Kísérletünkben a humuszanyagok nitrogéngáz környezetében 19%, levegőn 66% jódot kötöttek meg. Ez azt jelenti, hogy *in vivo* – amikor élettani körülmények között bőségesen áll rendelkezésre oxigén – is csökkenthetik a pajzsmirigy-hormonok szintéziséhez nélkülözhetetlen jód hozzáférhetőségét.

A HA_D esetében sem a kontrolltól való szignifikáns eltérést, sem dóziszfüggő hatást nem találtam. Ez ellentmond Herzig és mtsai. (2001) kísérleti eredményeinek. Ők sertések takarmányát egészítették ki Na-humáttal (HA-tartalom: 61,9%, az FA koncentrációját nem említik) és azt találták, hogy a bélsár jódtartalma szignifikánsan, a vizelet jódtartalma pedig tendenciózusan, bár nem szignifikánsan növekedett, ami azt jelenti, hogy csökkent a jód

felszívódása illetve nőtt a kiválasztása. Az ellentmondást az oldhatná fel, ha bebizonyosodna, hogy a vizsgálati anyagnak jelentős FA-tartalma is volt.

Huang és mtsai. (1994) azt találták, hogy egerekben a HA-nak önmagában (megfelelő szintű jódkiegészítés esetén) nem volt szignifikáns hatása a pajzsmirigy súlyára, a ^{125}I felvételére és a szérum T_4 -, T_3 -koncentrációjára. Csökkentett jódtartalmú diéta esetében viszont a HA kifejezetten növelte a pajzsmirigy ^{125}I felvételét, ami feltételezi a jód csökkent hozzáférhetőségét. Ennek egy fontos jelzője volt a szérum TSH-koncentrációjának növekedése is.

A kísérleti adatok alapján megerősítést nyert, hogy a HA_D nincs hatással a megfelelő jódtartalmú takarmányt fogyasztó patkányok pajzsmirigy-működésére.

A tapasztalatokat összefoglalva valószínűsíthető, hogy a szakirodalomban közölt hipotireoid hatásért a humuszanyagok FA-frakciója felelős. Ugyanakkor az is megállapítható, hogy elégséges jódellátás mellett az általam alkalmazott dózisok nem váltottak ki klinikai tünetekben megnyilvánuló hipotireoid hatást. Feltételezhető, hogy FA-tartalmú takarmány felvétele estén a jód bizonyos hányada jód-fulvát formájában van jelen a vérben, ami csökkenti a pajzsmirigysejtek hormonszintézisének hatékonyságát. Ennek következtében kénytelen a szervezet a hosszabb felezési idejű T_4 helyett a kevesebb jódot tartalmazó és rövidebb felezési idejű T_3 -at szintetizálni vagy a T_4 -et fokozott mértékben T_3 -á alakítani a periférián. Az adatokból látható, hogy ezért a hatásért, a humuszanyagok két – biológiailag legaktívabb – alkotórésze közül nem a HA_D felelős, mivel az a kísérletben nem befolyásolta szignifikánsan vagy dózistól függően a vér TSH, T_3 , és T_4 koncentrációját, illetve a T_4/T_3 -hányadost (22. táblázat).

A dóziszgörbe alapján feltételezhető, hogy a humuszanyagok szakirodalomban közölt hipotireoid hatásért a FA nagyobb (0,8% feletti) koncentrációja lehet a felelős. Ezen túlmenően – Huang és mtsai. (1994) vizsgálata alapján – a jódhiány hajlamosító tényezőként szerepelhet a hipotireozis kialakulásában. Az eredmények alapján kijelenthető, hogy amennyiben a humuszanyagokat takarmány-kiegészítőként alkalmazzuk (szerves mikroelem-kiegészítés, hozamfokozás, immunstimuláció) mérlegelnünk kell az esetleges negatív hatásokat is (pl. enyhe hipotireoid hatás). Érdemes arról is tájékozódni, hogy az adott takarmány-kiegészítő milyen arányban tartalmazza az FA-t és a HA-t, hogy meghozhassuk a takarmányozási szempontból megfelelő döntést.

Összefoglalva megállapítható, hogy

- sem az FA_D, sem a HA_D nem befolyásolta szignifikáns mértékben a vérplazma TSH-, T3- és T4-koncentrációját, valamint a T4/T3-hányadost,
- az FA_D-kiegészítés alkalmazott dózisaik ugyanakkor igen szoros pozitív korrelációban ($R = 0,991$) voltak a vérplazma TSH-szintjével, és negatívban a T₄/T₃-hányadossal ($R = -0,966$), azaz a szakirodalomban közölt hipotireoid hatásért nagy valószínűséggel a humuszanyagok FA-frakciója felelős,
- a fentiek alapján az FA_D e hatása dóziszfüggőnek tekinthető.

8.6. A fulvosav és a huminsav hatása a vastagbél-tartalom, valamint egyes szervek (máj, vese, csont, szőr) Fe-, Cu-, Zn- és Mn-koncentrációjára

8.6.1. Eredmények

Amint az a 23. táblázatban látható, a kísérletben vizsgált FA_D és HA_D egyaránt igen nagy koncentrációban tartalmazott vasat. A HA_D rézkoncentrációja 57%-al volt nagyobb az FA_D-énál. Az FA_D viszont cinkből (15,8-szor) és mangánból (5,6-szor) tartalmazott jelentősen többet, mint a HA_D.

23. táblázat. Az FA_D és a HA_D vas-, réz-, cink- és mangánkoncentrációja

	Fe	Cu	Zn	Mn
	(mg/kg)			
FA _D	2774	4,38	128,00	48,20
HA _D	2483	6,91	8,10	8,63

Az FA_D és a HA_D hatása a táp, a vastagbél-tartalom és a vizsgált szervek vaskoncentrációjára

A 24. és a 25. táblázat az FA_D és a HA_D hatását mutatja a vizsgálati minták vastartalmára.

24. táblázat. Az FA_D hatása a táp, a vastagbél-tartalom, a máj, a vese, a csont és a szőr vastartalmára

		FA _D -kiegészítés (%)				
		0	0,1	0,2	0,4	0,8
		A vas koncentrációja a tápban és a szervekben (mg/kg szá.)				
Táp	Átlag	41,60	44,37	47,15	52,70	63,79
	Változás (%)	0,00	6,66	13,34	26,68	53,34
Vastagbél-tartalom	Átlag	^a 720,00	^a 727,60	^b 858,50	^b 894,80	^c 1247,00
	Szórás	18,63	75,20	54,36	52,94	175,78
	Változás (%)	0,00	1,06	19,24	24,28	73,19
	Átlag	522,60	582,20	543,60	588,75	624,20
Máj	Szórás	73,04	110,22	45,09	40,99	101,61
	Változás (%)	0,00	11,40	4,01	12,66	19,44
Vese	Átlag	^a 263,60	^b 306,20	^b 274,00	^b 298,80	^b 279,60
	Szórás	9,10	23,91	2,55	15,58	14,83
	Változás (%)	0,00	16,16	3,94	13,35	6,07
	Átlag	284,25	284,80	233,75	285,00	269,25
Csont	Szórás	55,62	59,31	30,09	11,38	18,34
	Változás (%)	0,00	1,93	-17,77	0,26	-5,28
Szőr	Átlag	13,70	12,60	13,60	11,90	14,10
	Változás (%)	0,00	-8,03	-0,73	-13,13	2,92

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns (p<0,05) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

25. táblázat. A HA_D hatása a táp, a vastagbélartalom, a máj, a vese, a csont és a szőr vastartalmára

		HA _D -kiegészítés (%)				
		Kontroll	0	0,1	0,2	0,4
		A vas koncentrációja a tápban és a szervekben (mg/kg sza.)				
Táp	Átlag	41,60	44,08	46,57	51,53	61,46
	Változás (%)	0,00	5,96	11,95	23,87	47,74
Vastagbélartalom	Átlag	720,00	709,80	715,75	723,00	764,20
	Szórás	18,63	32,71	50,70	40,31	56,65
Máj	Változás (%)	0,00	-1,42	-0,59	0,42	6,14
	Átlag	^a 522,60	^a 496,40	^b 358,20	^b 395,20	^b 402,60
Vese	Szórás	73,04	80,22	62,28	28,09	40,59
	Változás (%)	0,00	-5,01	-31,45	-24,38	-22,96
Csont	Átlag	^a 263,60	^a 273,40	^a 239,60	^a 243,80	^b 230,50
	Szórás	9,10	22,05	26,32	22,86	3,20
Szőr	Változás (%)	0,00	3,72	-9,10	-7,51	-12,56
	Átlag	284,25	274,67	272,00	328,00	250,33
	Szórás	55,62	61,95	29,47	61,26	52,80
	Változás (%)	0,00	-3,37	-4,31	15,39	-11,93
	Átlag	13,70	13,80	12,50	13,20	13,30
	Változás (%)	0,00	0,73	-8,76	-3,65	-2,92

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

Az FA_D és a HA_D – nagy vastartalmuk miatt – dózistól függően emelték az alkalmazott tápok vaskoncentrációját. Figyelembe véve a patkányok mikroelem-igényét (Fe: 35, Cu: 5, Zn: 12 és Mn: 5 mg/kg táp; NRC 1995), csak a kísérleti tápok vaskoncentrációjának változása tekinthető jelentősnek, ugyanis a legnagyobb FA_D-, vagy HA_D-kiegészítés (0,8%) 53, illetve 48%-al emelte a patkánytáp vastartalmát.

A 24. táblázatban látható, hogy az FA_D 0,2; 0,4 és 0,8%-os dózisa szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte a vastagbélartalom vastartalmát. A HA_D esetében még a legnagyobb koncentrációnál sem tapasztaltunk lényeges eltérést a kontrollhoz képest (25. táblázat).

A HA_D 0,2; 0,4 és 0,8%-ban adagolva – a kontrollhoz képest – szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette máj vastartalmát. Az FA_D nem befolyásolta ezt a paramétert.

Az FA_D-kiegészítés minden dózisa szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte a vese vaskoncentrációját. Ezzel szemben a HA_D 0,2%-ban, és a feletti koncentrációban csökkentette a vese vastartalmát. A csökkenés a 0,8%-os kiegészítés esetén szignifikáns ($p < 0,05$) volt.

A combcsont vastartalmának vizsgálatakor nem találtam szignifikáns eltérést a csoportok eredményeinek összevetésekor.

A szőr esetében az egyesített minták miatt csoportonként csak átlageredményt tudtam megállapítani, így szignifikancia számolására nem volt lehetőség.

Az FA_D és a HA_D hatása a táp, a vastagbél tartalom és a vizsgált szervek rézkoncentrációjára

A 26. és a 27. táblázat az FA_D és a HA_D hatását mutatja a vizsgálati minták réztartalmára.

26. táblázat. Az FA_D hatása a táp, a vastagbél tartalom, a máj, a vese, a csont és a szőr réztartalmára

		FA _D -kiegészítés (%)				
		0	0,1	0,2	0,4	0,8
		A réz koncentrációja a tápban és a szervekben (mg/kg szá.)				
Táp	Átlag	7,50	7,50	7,51	7,52	7,53
	Változás (%)	0,00	0,00	0,13	0,27	0,40
Vastagbél tartalom	Átlag	^a 142,80	^b 130,00	^b 128,40	^c 121,20	^c 120,00
	Szórás	4,92	2,12	8,38	7,09	10,77
	Változás (%)	0,00	-8,96	-10,08	-15,13	-15,97
	Átlag	^a 13,53	^{ab} 14,02	^b 15,46	^{ab} 14,92	^b 15,16
Máj	Szórás	0,51	1,49	1,32	1,81	0,83
	Változás (%)	0,00	3,62	14,26	10,27	12,05
	Átlag	22,30	21,76	21,50	21,80	23,30
Vese	Szórás	2,33	5,11	1,27	1,97	2,70
	Változás (%)	0,00	-2,42	-3,59	-2,24	4,48
	Átlag	8,95	8,58	8,73	8,98	9,25
Csont	Szórás	0,68	0,72	0,31	0,53	0,38
	Változás (%)	0,00	-4,13	-2,46	0,33	3,35
	Átlag	12,30	12,50	12,30	12,60	12,40
Szőr	Változás (%)	0,00	1,62	0,00	2,44	0,81

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns (p<0,05) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

27. táblázat. A HA_D hatása a táp, a vastagbélartalom, a máj, a vese, a csont és a szőr réztartalmára

		HA _D -kiegészítés (%)				
		0	0,1	0,2	0,4	0,8
		A réz koncentrációja a tápban és a szövetekben (mg/kg szá.)				
Táp	Átlag	7,50	7,51	7,51	7,53	7,55
	Változás (%)	0,00	0,13	0,13	0,40	0,67
Vastagbélartalom	Átlag	^a 142,80	^b 122,20	^b 127,75	^c 111,75	^d 98,08
	Szórás	4,92	4,87	5,22	9,96	2,09
	Változás (%)	0,00	-14,43	-10,54	-21,74	-31,32
	Átlag	^a 13,53	^b 14,80	^c 12,35	^{ab} 14,14	^{ab} 13,66
Máj	Szórás	0,51	0,96	0,23	1,47	1,21
	Változás (%)	0,00	9,39	-8,72	4,51	0,96
	Átlag	22,30	22,56	22,54	23,38	24,48
Vese	Szórás	2,33	1,28	0,46	0,76	0,87
	Változás (%)	0,00	1,17	1,08	4,84	9,78
	Átlag	8,95	8,88	8,98	8,80	8,77
Csont	Szórás	0,68	0,34	0,21	0,27	0,09
	Változás (%)	0,00	-0,78	0,33	-1,68	-2,01
	Átlag	12,30	12,30	12,40	12,50	12,10
Szőr	Változás (%)	0,00	0,00	0,81	1,62	-1,62

A különböző betűk a kitevőben szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

A testanyagok relatíve kis réztartalma nem befolyásolta számottevően a tápok réztartalmát.

Az FA_D és a HA_D mindegyik dózisa szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a vastagbélartalom rézkoncentrációját a kontrollhoz képest.

A máj réztartalmát – a kontrollhoz képest – szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte a táp FA_D-val való 0,2 és 0,8%-os kiegészítése. A HA_D-t tartalmazó tápot fogyasztó csoportok esetében – a kontrollhoz képest – a 0,1%-os kiegészítés szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte, a 0,2%-os kiegészítés viszont szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a máj réztartalmát. A nagyobb (0,4 és 0,8%) HA_D-kiegészítésű tápok nem befolyásolták ezt a paramétert.

A testanyagok egyik dózisa sem fejtett ki szignifikáns hatást a vese, és a combcsont réztartalmára.

A szőr esetében – az egyesített minták miatt – csoportonként csak átlageredményt tudtam megállapítani, így nem volt lehetőség statisztikai analízisre.

Az FA_D és a HA_D hatása a táp, a vastagbél tartalom és a vizsgált szervek cinkkoncentrációjára

A 28. és a 29. táblázat az FA_D és a HA_D hatását mutatja a vizsgálati minták cinktartalmára.

28. táblázat. Az FA_D hatása a táp, a vastagbél tartalom, a máj, a vese, a csont és a szőr cinktartalmára

		Kontroll	FA _D -kiegészítés (%)			
		0	0,1	0,2	0,4	0,8
		A cink koncentrációja a tápban és a szervekben (mg/kg szá.)				
Táp	Átlag	56,10	56,23	56,36	56,61	57,12
	Változás (%)	0,00	0,23	0,46	0,91	1,82
Vastagbél tartalom	Átlag	795,60	745,20	752,50	721,60	732,20
	Szórás	39,18	42,36	16,65	66,01	66,82
	Változás (%)	0,00	-6,33	-5,42	-9,30	-7,97
Máj	Átlag	104,56	101,00	106,68	103,56	104,40
	Szórás	11,39	5,28	9,32	13,51	10,16
	Változás (%)	0,00	-3,40	2,03	-0,96	-0,15
Vese	Átlag	^a 96,70	^b 89,35	^{ab} 91,86	^b 90,13	^b 92,20
	Szórás	6,21	0,93	2,03	1,50	4,72
	Változás (%)	0,00	-7,60	-5,00	-6,79	-4,65
Csont	Átlag	^a 473,75	^{ab} 456,20	^{ab} 461,75	^a 469,00	^b 443,50
	Szórás	11,28	32,02	32,90	19,04	14,43
	Változás (%)	0,00	-3,70	-2,53	-1,00	-6,38
Szőr	Átlag	289,00	290,00	286,00	297,00	293,00
	Változás (%)	0,00	0,35	-1,04	2,77	1,38

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns (p<0,05) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

29. táblázat. A HA_D hatása a táp, a vastagbélartalom, a máj, a vese, a csont és a szőr cinktartalmára

		HA _D -kiegészítés (%)				
		0	0,1	0,2	0,4	0,8
		A cink koncentrációja a tápban és a szervekben (mg/kg szá.)				
Táp	Átlag	56,10	56,11	56,12	56,13	56,16
	Változás (%)	0,00	0,02	0,04	0,05	0,11
Vastagbélartalom	Átlag	^a 795,60	^b 742,40	^b 736,00	^c 666,75	^c 596,80
	Szórás	39,18	29,32	34,42	41,94	91,05
	Változás (%)	0,00	-6,69	-7,49	-16,20	-24,99
Máj	Átlag	104,56	102,94	97,70	106,20	99,62
	Szórás	11,39	11,03	1,52	9,12	4,39
	Változás (%)	0,00	-1,55	-6,56	1,57	-4,72
Vese	Átlag	96,70	94,36	93,26	91,58	92,14
	Szórás	6,21	5,21	3,28	4,60	4,18
	Változás (%)	0,00	-2,42	-3,56	-5,29	4,72
Csont	Átlag	^a 473,75	^b 455,50	^{ab} 461,75	^b 451,00	^{ab} 466,00
	Szórás	11,28	7,94	9,81	10,92	8,52
	Változás (%)	0,00	-3,85	-2,53	-4,80	-1,63
Szőr	Átlag	289,00	284,00	290,00	293,00	288,00
	Változás (%)	0,00	-1,73	0,35	1,38	-0,35

A különböző betűk az értékek előtti felső indexben szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget jelölnek az azonos sorban lévő adatok között.

A tesztanyagok nem befolyásolták számottevően a tápok cinktartalmát.

Az FA_D egyik dózisa sem változtatta meg a vastagbélartalom cinktartalmát, ezzel szemben a HA_D mindegyik koncentrációban szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette annak cinktartalmát.

Az FA_D 0,1; 0,4 és 0,8%-os szintje szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a vese cinkkoncentrációját. A HA_D egyik dózisa sem befolyásolta ezt a paramétert szignifikánsan.

Az FA_D 0,8%-os, a HA_D 0,1 és 0,4%-os adagja szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a combcsont cinktartalmát.

A szőr esetében – az egyesített minták miatt – csoportonként csak átlageredményt tudtam megállapítani, így nem volt lehetőség statisztikai analízisre.

Az FA_D és a HA_D hatása a táp, a vastagbél tartalom és a vizsgált szervek mangánkoncentrációjára

A 30. és a 31. táblázat az FA_D és a HA_D hatását mutatja a vizsgálati minták mangántartalmára.

30. táblázat. Az FA_D hatása a táp, a vastagbél tartalom, a máj, a vese, a csont és a szőr mangántartalmára

		Kontroll	FA _D -kiegészítés (%)			
		0	0,1	0,2	0,4	0,8
		A mangán koncentrációja a tápban és a szervekben (mg/kg szá.)				
Táp	Átlag	11,00	11,05	11,10	11,19	11,39
	Változás (%)	0,00	0,45	0,91	1,73	3,55
Vastagbél tartalom	Átlag	262,00	254,20	262,80	210,80	243,20
	Szórás	46,64	30,45	17,85	42,79	42,84
	Változás (%)	0,00	-2,98	0,31	-19,54	-7,18
	Átlag	8,88	9,01	9,70	8,92	8,84
Máj	Szórás	0,44	0,93	0,81	0,42	0,97
	Változás (%)	0,00	1,46	9,23	0,45	-0,45
	Átlag	3,91	3,90	3,81	3,86	4,10
	Szórás	0,14	0,23	0,33	0,26	0,36
Vese	Változás (%)	0,00	-0,26	-2,56	-1,28	4,85
	Átlag	6,48	6,56	6,18	5,67	5,88
	Szórás	0,31	0,53	0,29	0,22	0,33
	Változás (%)	0,00	1,23	-4,63	-12,50	-9,26
	Átlag	0,76	0,84	0,87	0,86	0,88
	Változás (%)	0,00	10,53	14,47	13,16	15,79

31. táblázat. A HA_D hatása a táp, a vastagbél tartalom, a máj, a vese, a csont és a szőr mangántartalmára

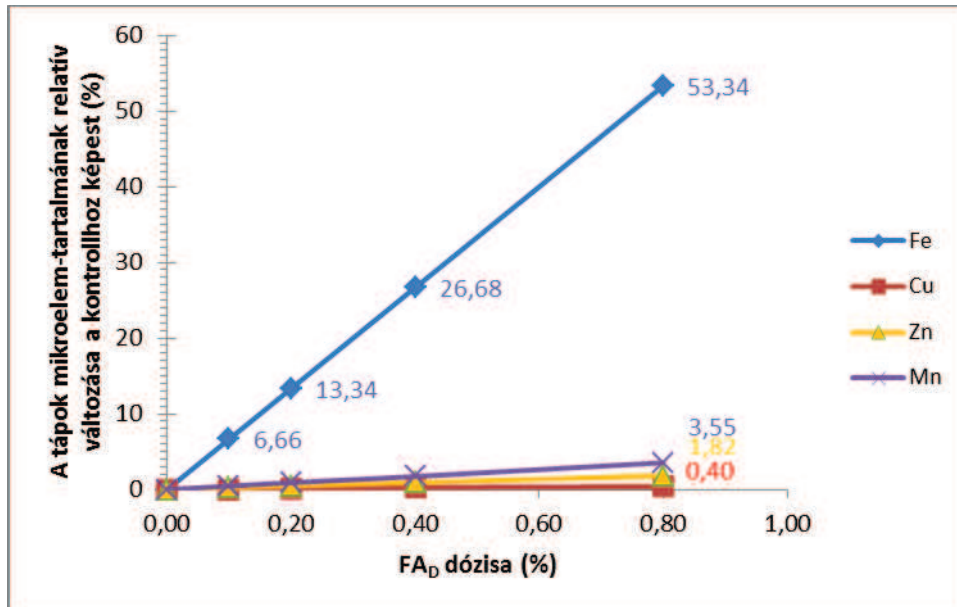
		Kontroll	HA _D -kiegészítés (%)			
		0	0,1	0,2	0,4	0,8
		A mangán koncentrációja a tápban és a szervekben (mg/kg szá.)				
Táp	Átlag	11,00	11,01	11,02	11,03	11,07
	Változás (%)	0,00	0,09	0,18	0,27	0,64
Vastagbél tartalom	Átlag	262,00	256,60	206,20	218,40	202,40
	Szórás	46,64	44,74	53,16	22,56	16,38
	Változás (%)	0,00	-2,06	-21,30	-16,64	-22,75
Máj	Átlag	8,88	9,52	8,12	8,81	8,37
	Szórás	0,44	0,68	0,95	0,26	0,53
	Változás (%)	0,00	7,20	-8,56	-0,79	-5,74
Vese	Átlag	3,91	4,03	3,91	3,85	3,91
	Szórás	0,14	0,26	0,11	0,14	0,29
	Változás (%)	0,00	3,07	0,00	-1,53	0,00
Csont	Átlag	6,48	5,77	5,80	6,37	6,03
	Szórás	0,31	0,52	0,32	0,29	0,33
	Változás (%)	0,00	-10,96	-10,49	-1,70	-6,94
Szőr	Átlag	0,76	0,85	0,82	0,81	0,83
	Változás (%)	0,00	11,84	7,89	6,59	9,21

Az FA_D és a HA_D egyik dózisa sem befolyásolta szignifikánsan a táp, a vastagbél tartalom, a máj, a vese, a combcsont és a szőr mangántartalmát.

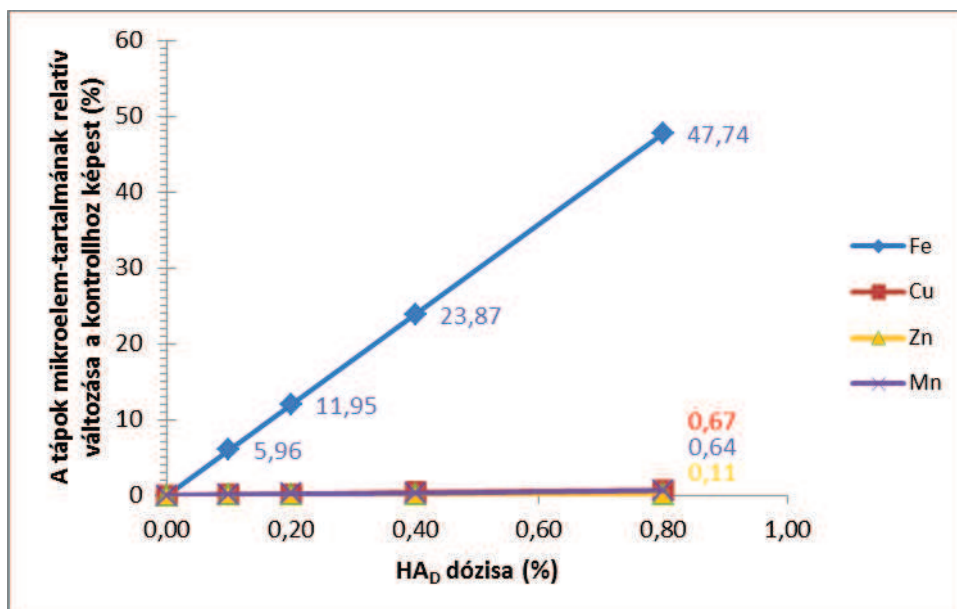
8.6.2. Megbeszélés

Az FA_D és a HA_D hatása a tápok mikroelem-koncentrációjára

A 18. és a 19. ábra az FA_D-nak és a HA_D-nak tápok mikroelem-koncentrációjára kifejtett hatását szemlélteti.



18. Ábra. A tápok mikroelem-tartalmának relatív változása az FA_D-kiegészítés hatására a kontrollhoz (100%) képest



19. Ábra. A tápok mikroelem-tartalmának relatív változása a HA_D-kiegészítés hatására a kontrollhoz (100%) képest

Amint azt a 18. és 19. ábra mutatja, az FA_D- és HA_D-kiegészítéssel csak vas került számottevő mennyiségben a kísérleti tápokba. Ez azt jelenti, hogy a tápok vastartalma még kis FA_D- illetve HA_D-kiegészítés esetén is szignifikánsan változhat.

Az FA_D- és HA_D-kiegészítés nem változtatta meg számottevően a kontrollhoz képest a tápok réz-, cink- és mangántartalmát.

Az FA_D- és HA_D-kiegészítés kétféle módon hathat a vastagbél-tartalom mikroelem-koncentrációjára. Egyrészt – pl. a vas esetében – lényeges mértékben növelhetik a bevitt mennyiséget, másrészt – kelátképző tulajdonságuk miatt – befolyással lehetnek a mikroelemek felszívódására is.

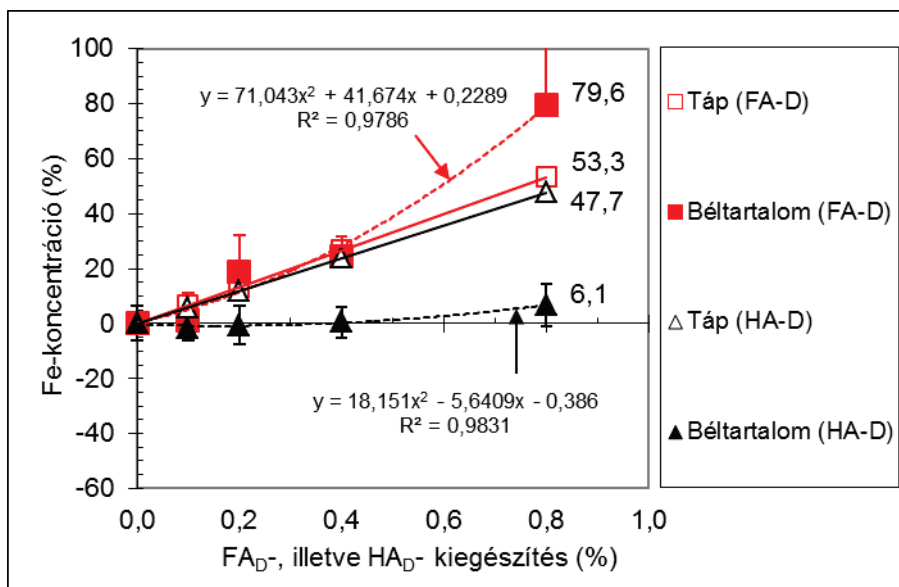
Amikor értékeljük a vastagbél-tartalom mikroelem-koncentrációjának változását, a vas vonatkozásában mindkét szempontot, a réz, cink és mangán esetében viszont elsősorban a tesztanyagok kelátképző képességének hatását kell figyelembe venni.

Annak előfeltétele, hogy a bél-tartalom mikroelem-koncentrációjának változásából a felszívódásuk hatékonyságára tudjunk következni az, hogy a mintavétel idejében ne legyen lényeges eltérés a kontroll- és a kísérleti csoportok között a táp szervesanyag-tartalmának (fehérje, szénhidrát, zsír) emészthetőségében. Ez a feltétel megvalósult a kísérletben, hiszen a vastagbél-tartalom-minták vételét megelőző időszakban – a kísérlet utolsó 5 napjában – a takarmányfogyasztás, az átlagos napi súlygyarapodás és a fajlagos takarmány-felhasználás egyik kezelés estében sem tért el szignifikáns mértékben a kontrolltól. Ez alapján joggal feltételezhető, hogy a tápok szervesanyag-tartalmának emészthetősége sem különbözik lényegesen a kontrolltól.

Vas

A vasszívódás mértékének legfontosabb élettani meghatározó tényezője a szervezet mindenkori vastartalma (Magnuson és mtsai, 1981; Taylor és mtsai. 1988; Lynch és mtsai., 1989; Hallberg és mtsai., 1997), amely unipolárisan, a felszívódás szintjén szabályozott (David és Anderson, 2005).

A felszívódás folyamatának első lépcsője a vas felvétele a bélhámsejtekbe azok apikális membránján keresztül. Ezt a folyamatot a kefeszegélyben elhelyezkedő DMT1 (divalent metal transporter 1) szabályozza. A DMT1-molekula szintézisének intenzitását a vasszabályozó fehérjék határozzák meg (IRPs = iron regulatory proteins). A folyamat negatív visszacsatoláson alapul, melyben a szervezet mindenkori vasháztartása szabályozza a DMT1 szintézisét, így határozva meg a bélcsatornából történő vasszívódás intenzitását. A véráramba nem jutó vas az enterocitákban ferritinhez kötötten raktározódik, és amikor a hámsejt a bélnyálkahártyáról a bélcsatornába kerül, vastartalma végleg elvész a szervezet számára. A táp, illetve a vastagbél-tartalom vaskoncentrációjának változása – azonos szervesanyag-emésztési együttható esetén – a vas felszívódásának hatékonyságáról ad közvetett információt.



20. ábra. Az FA_D és a HA_D hatása a tápok és a vastagbéltartalom vastartalmának relatív változására a kontrollhoz (0%) viszonyítva

A 20. ábrán az látható, hogy az FA_D dózisa szoros korrelációt (R=0,987) mutat a vastagbéltartalom vaskoncentrációjával. Mivel 0,4%-os szintig az FA_D-kiegészítés mértékével párhuzamosan nőtt a vaskoncentráció mind a tápban, mind a vastagbéltartalomban, a bevitelhez képest felszívódott vas százalékos aránya megegyezett a kontrollal. Ez természetesen abszolút értelemben az FA_D-kiegészítéssel arányosan növekvő mennyiségű vas felszívódását jelenti. Ezzel szemben a 0,8%-os FA_D-kiegészítés esetén a vastagbéltartalom vastartalmának relatív változása (73,2%) mintegy 20 abszolút %-al múlta felül a tápét (53,3%). Ez arra utal, hogy az FA_D-s tápot fogyasztó állatok esetében a 0,8%-os dózisonál már romlik a vas felszívódásának hatékonysága.

Ez a tapasztalat megegyezik a Yeung és mtsai. (2005) által közltekkel. Ők patkányokban azt találták, hogy nagy mennyiségű (1200 mg/kg takarmány) szervetlen (FeSO₄), illetve kelátkötésben (NaFeEDTA) lévő vasat tartalmazó táp etetése esetén a kísérlet 28. napjára szignifikánsan (p<0,05) csökkent a vafelszívódás az 1. napi szinthez képest. Ezek az eredmények és az FA_D-s adatok is azt támasztják alá, hogy a patkányok a vafelszívódás hatékonyságának csökkentésével (down-regulation) alkalmazkodtak a nagy vasbevitelhez. Whittaker és mtsai. (2002) akut vastoxotációs vizsgálatban szintén megfigyelték, hogy a szükséglet felett adott vas esetén csökken a felszívódás hatékonysága ami a vas homeosztázisának unipoláris szabályozásából is következik.

A 20. ábrán az is látható, hogy – a kontrollcsoporthoz képest – a HA_D még a legnagyobb koncentrációban alkalmazva sem okoz lényeges eltérést a vastagbéltartalom vaskoncentrációjában. Ebből arra következtethetünk, hogy a vasban gazdag HA_D dózisának növelésével – ami a táp vastartalmának emelkedését vonta maga után – azzal arányosan,

nagyobb mennyiségű vas szívódott fel. Azaz a HA_D esetében nem tapasztaltam a vasszívódás FA_D-nál látott csökkenését (down regulation). Sőt, a felszívódás lényeges javulására utal az a tény, hogy – a táp vastartalmának növekedése ellenére – minden dózisonál gyakorlatilag azonos maradt a vastagbél-tartalom vaskoncentrációja. Ez a koncentrációbeli különbség a táp és a vastagbél-tartalom között a legnagyobb adagnál (0,8%) már több, mint 40% volt (a változás a kontrollhoz képest a táp esetén 47,7%, a vastagbél-tartalom esetén pedig 6,1%). Ennek alapján felmerül a kérdés, hogy miként javíthatja a nagy molekulatömegűnek feltételezett HA_D a vas felszívódását, hiszen általános az a nézet, hogy a humuszanyagok közül a FA kis molekulatömegű (2000 Da körüli), jól felszívódó, a HA pedig nagy molekulatömegű (5000-150000 Da), emiatt gyengén felszívódó frakció (Islam és mtsai., 2005; Zrally és mtsai., 2008). Livens (1991) szerint a HA erősen megkötö a fémeket (nehézfémek, Fe, Cu, Zn, Mn, stb.), így csökkenti azok felszívódását a bélcsatornából.

A fentiek alapján az volt várható, hogy a HA_D a bél-lumenben tartja a vasat, azaz növeli koncentrációját a bél-tartalomban, miközben ennek pont az ellenkezőjét tapasztaltam (20. ábra). Az adatok ugyanis azt támasztják alá, hogy a HA_D nem tartja a vasat a bél-lumenben, ami arra utal, hogy az vas-humát formájában felszívódik.

Ez a jelenség akkor lenne érthető, ha a HA_D kisebb molekulatömegű lenne, mint arról a fentiekben szó volt. Erre vonatkozólag találunk bizonyítékot Pena-Méndez és mtsai. (2005) közleményében, akik azt állítják, hogy a HA jóval kisebb molekulákból áll, mint azt korábban feltételezték. Eredményeik alapján a nagy molekulatömegre vonatkozó adatok onnan eredhetnek, hogy a HA-molekulák igen hajlamosak az aggregálódásra. Hosse és Wilkinson (2001) megfigyelték, hogy a HA-molekulák alacsony pH-n dimereket és trimereket képeznek, és ezekből indul ki az aggregáció, aminek a nagy molekulatömegű HA az eredménye. Ezen túlmenően a FA és a HA molekulatömegét az is befolyásolhatja, hogy azokat milyen forrásból vonták ki. Shinozuka és mtsai. (2003) megállapították, hogy minél előrehaladottabb állapotban van a szénképződési fázisban az az alapanyag, amelyből kivonták a humuszanyagokat, annál kisebb volt a belőlük kivont FA és HA molekulatömege, ráadásul nagy átfedést tapasztaltak a két anyag molekulatömeg-tartományában.

A kísérletben barnaköszénből (Dudarit) kivont FA_D-t és HA_D-t használtam. Eredményeim alapján feltételezhető, hogy a természetben előforduló egyik legkisebb molekulatömegű – azaz jól felszívódó – FA_D-val és HA_D-val dolgoztam.

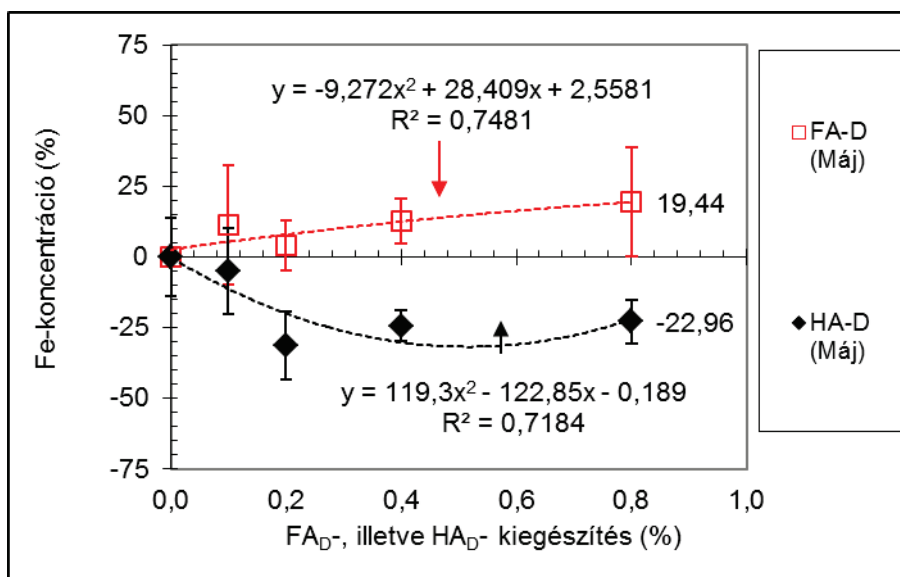
Éppen ezért meglepő, hogy az eredmények szerint az FA_D és a HA_D ellentétesen befolyásolta a vaskoncentrációt a vastagbél-tartalomban, következésképpen a vasszívódást. Míg az FA_D 0,8%-os kiegészítésénél csökkent, a HA_D ugyanilyen dózisa esetén éppen ellenkezőleg, nőtt a vasszívódás.

A tapasztalt jelenség magyarázatául az FA és a HA vassal alkotott kötésének erőssége szolgálhat. Nagy valószínűség szerint az FA lazább kötésben tartja a vasat, mint a HA. Ennek következtében, miután tápbeli arányának növelésével folyamatosan emelkedik a felszívott vas mennyisége, ez – a vasraktárak feltöltése után – a felszívódás le szabályozásához vezetett.

Ezzel ellentétben az adatok arra utalnak, hogy a HA az FA-nál erősebben köti meg a vasat, így valószínűleg nem adja le azt sem a bélhámsejteknek, sem a szerveknek. Ez utóbbit bizonyítja, hogy kísérletünkben a HA_D dózisának növelésével csökkent a szervek (máj, vese) vastartalma. Következésképpen a HA_D-val bevitt többletvas nem eredményezte a szervek vasellátásának javulását, sőt mobilizálta a vasraktárakból a vasat, ami a szervezetben egy vashiányos állapotot válthatott ki ezzel is serkentve a vas bélből történő felszívódásának intenzitását.

A májban a ferritinhez kötött vas jelenti a szervezet számára a leggyorsabban és legnagyobb mennyiségben hozzáférhető vasforrást. A májnak a vas felszívódásában játszott központi szerepére a hepcidin felfedezésével derült fény (Nicolas és mtsai., 2001). Ezt a kis peptidet a májsejtek juttatják a keringésbe és a molekula gátolja a vas bélcsatornából történő felszívódását. Ezt a mechanizmust Frazer és mtsai. (2005) is igazolták, amikor vasszegény táp etetésének hatására kétszeresére emelkedett a vasszívódás és szignifikánsan csökkent a máj által szintetizált hepcidin mennyisége. A májnak a vasraktározásban is fontos szerepe van, mivel az a májsejtekben raktározódik ferritinhez kötve.

A 21. ábra az FA_D-nak és a HA_D-nak a máj vaskoncentrációjára kifejtett hatását szemlélteti.



21. ábra. A FA_D és a HA_D hatása a tápok és a máj vastartalmának relatív változására a kontrollhoz (0%) viszonyítva

Amint az a 21. ábrán látható, a HA_D-t 0,2; 0,4 és 0,8%-ban adagolva – a kontrollhoz képest – szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a máj vastartalmát, míg az FA_D esetében – jóllehet enyhe növekedés figyelhető meg – nem szignifikáns az eltérés.

A máj vaskoncentrációjának csökkenése ellentmond Appel és mtsai. (2001) eredményeinek, akik azt találták, hogy nagyobb vasfelvétel esetén nő a máj vastartalma. A mi kísérletünkben – annak ellenére, hogy az alkalmazott HA_D-dózissal arányosan nőtt a felszívott vas mennyisége – csökkent a máj vastartalma.

Felmerül a kérdés, hogy mi a magyarázata az adataink és az Appel és mtsai. (2001) által tapasztaltak közötti ellentmondásnak. A kérdés megválaszolásában lényeges szerepe lehet annak, hogy a HA_D kelát formájában, erősen köti meg a vasat és valószínűleg azt nem adja le a májban. Ezt a feltevést az alábbi irodalmi adatok is alátámasztják.

A vasat szerves kötésben tartalmazó NaFeEDTA szignifikánsan csökkentette a máj vastartalmát a szervetlen vasforráshoz (FeSO₄) képest abban az esetben, amikor mindkét forrásból (szerves és szervetlen) ugyanolyan mennyiségű vas szívódott fel (Yeung és mtsai., 2005). Ez arra utal, hogy az EDTA – ami a vassal a HA-hoz hasonlóan kelátot képez – képes lehet a vas mobilizálására is a májból. Ezen az elven alapul a haemolitikus anémiában szenvedő betegek gyógykezelése is, melynek során kelátképző anyagokat használnak a vörösvértestekből kiszabaduló vasnak a szervezetből történő eltávolítására (Jurado, 1997). Nehézfémekkel (Pb és Cd) végzett kísérletekben (Zrally és mtsai., 2008; Herzig és mtsai., 1994) kimutatták, hogy HA-val egy időben adagolva szignifikánsan ($< 0,05$) csökkent azok koncentrációja a májban.

A kapott eredmények alapján feltételezhetjük, hogy – hasonlóan a fent említett nehézfémekhez – a HA molekuláris szerkezetének és számos funkcionális csoportjának köszönhetően, még a szervezetben is megkötheti, illetve kötött formában tarthatja a vasat. Ennek következtében annak ellenére csökkentette a máj vaskoncentrációját, hogy a HA_D-s kiegészítést fogyasztó állatokban a kontrollhoz képest lényegesen jobb volt a vasfelszívódás.

A feltételezett mechanizmus hátterében az állhat, hogy a HA_D úgy működik, mint egy metalloprotein molekula. Amennyiben telített a szabad fémkötő kapacitása, fehérje típusú molekuláknak (pl. szállítófehérjék) képes átadni a fémet. Abban az esetben viszont, amikor nagy a szabad fémkötési kapacitása, átveszi a fémet a metalloproteinektől (pl.: ferritintől) és elősegíti azok kiürülését a szervezetből (Zrally és mtsai. 2008). A kísérletünkben használt HA_D fémkötési kapacitása nagy valószínűséggel nem volt telített, így a ferritintől átvéve a vasat, csökkentette az elsődleges vasraktár, a máj vastartalmát.

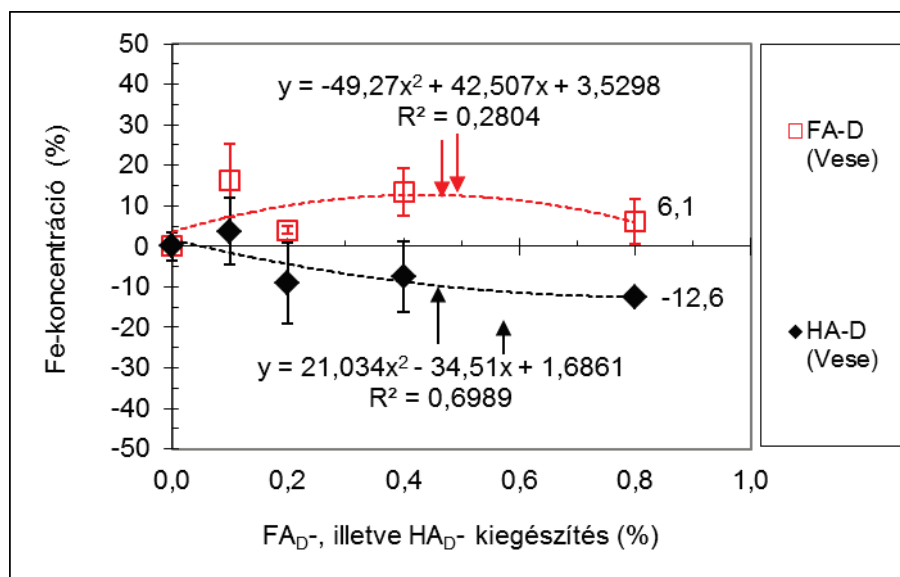
Az eredmények alapján világosan látszik, hogy az FA_D-, illetve HA_D-kiegészítés ellentétesen befolyásolta a máj vaskoncentrációját. Ennek hátterében feltételezhetően az áll, hogy a FA_D gyengébben köti a vasat, mint a HA_D.

Jóllehet eddigi ismereteink szerint a szervezet vashomeosztázisa unipolárisan, a felszívódás szintjén szabályozott, kiválasztása viszont a bőr hámlásával, az epével, a bélnyálkahártyáról a béllumenbe kerülő enterocytákkal és a vesén keresztül egyaránt végbemehet (Hunt és mtsai., 2009).

A vesének a vashomeosztázisban játszott fontos szerepét mostanában kezdjük megérteni. Wareing és mtsai. (2000) leírták, hogy a szérumvas jelentős része bekerülhet a glomerulusszűrletbe, viszont annak legnagyobb része – főként a Henle-féle kacsban és a disztális tubulusokban – vissza is szívódik, így válik újrahasznosíthatóvá a szervezet számára. A vesében – a bélhez hasonlóan – a vasvisszaszívás szabályozásában a prohepcidin, a ferroportin (MTP 1) és a divalent metal transporter molekula (DMT1) játssza a fő szerepet (Donovan és mtsai., 2000; McKie és mtsai., 2000; Kulaksiz és mtsai. 2005).

Veuthey és mtsai. (2008) hemolitikus anémiát idéztek elő egerekben, hogy választ kapjanak arra a kérdésre, mi a szerepe a hepcidin-, az MTP 1- és a DMT 1-molekulának a vese vasforgalmában. Azt találták, hogy amennyiben növekszik a szervezet vasigénye, csökken a vesében mérhető prohepcidin. A prohepcidin csökkenésének következtében nő a proximális tubulusokban a DMT 1 mennyisége, így több vas szívódik vissza a glomerulusszűrletből, amit az MTP 1 juttat újra a keringésbe. Eredményeik alapján arra a következtetésre jutottak, hogy a vas vesén keresztül történő ürülésének fő szabályozója a szervezet mindenkori vasigénye. A fentiek alapján érthető, hogy a vese is rendkívül fontos szerepet játszik a vashomeosztázisban.

A 22. ábra az FA_D és a HA_D hatását szemlélteti a vas vesében mért koncentrációjára a kontrollcsoporthoz képest.



22. ábra. Az FA_D és a HA_D hatása a tápok és a vese vastartalmának relatív változására a kontrollhoz (0%) viszonyítva

A 22. ábrán látható, hogy az FA_D-kiegészítés minden dózisa szignifikánsan ($p < 0,05$) növelte a vese vaskoncentrációját. Ezzel szemben a HA_D 0,2%-ban és a feletti koncentrációban csökkentette azt. A csökkenés a 0,8%-os kiegészítés esetén szignifikáns ($p < 0,05$) volt.

Az FA szervezetben belüli forgalmáról keveset tudunk. Kis molekulatömege miatt minden bizonnyal jelentős mennyiség szívódik fel a bélcsatornából (Islam és mtsai., 2005). Fraioli és mtsai. (2001) igen nagy FA-tartalmú ásványvíz, úgynevezett Fiuggi víz Ca-oxalát-mikrokristályokra kifejtett hatását vizsgálták olyan betegeken, akik rendszeresen visszatérő idiopátiás Ca-oxalát típusú vesekő okozta betegségben szenvedtek. Azt találták, hogy az ásványvízben lévő FA feloldja a keletkezett kristályokat, azaz komplexbe viszi a Ca-oxalátban lévő kalciumot. Vizsgálatukból arra következtethetünk, hogy a felszívódott FA egy része a vesén keresztül a vizelettel ürül. Ezt a tényt erősítik meg a mi adataink is, mivel az FA_D minden dózisban növelte a vesében mért vaskoncentrációt. Ez nagy valószínűséggel abban az esetben fordulhat elő, ha a Fe-fulvát komplex kiválasztódik a glomerulus szűrletbe és a vese tubulusaiban – esetlegesen az alacsony pH hatására – disszociál. Az így szabaddá vált vasat a DMT 1 molekula juttatja vissza a tubulus hámsejtjeibe. Arra a kérdésre, hogy miért nem vagy – a reabszorpcióhoz képest – csak csökkent mértékben történik meg a vas elszállítása a veséből, a kísérleti adataiból és az irodalom alapján nem tudok egyértelmű választ adni. A mechanizmus pontos tisztázásának érdekében érdemes lenne megvizsgálni az FA-nak a vesében keletkező prohepcidin, DMT 1, MTP 1 és ferritin mennyiségére kifejtett hatását.

A 22. ábrán látható, hogy – ellentétben az FA_D esetében tapasztaltakkal – a HA_D-s tápot fogyasztó állatok vesemintáiban a 0,2%, vagy annál nagyobb dózis csökkentette a vese vaskoncentrációját, de szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget csak a 0,8%-os kiegészítést fogyasztóknál mértem.

Hasonló megfigyelést tettek Zraly és mtsai. (2008) Pb-acetáttal végzett kísérletükben. Kimutatták, hogy HA hatására szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkent az ólom koncentrációja a vesében.

Az eredmények alapján feltételezhetjük, hogy a HA – molekuláris szerkezetének és számos funkcionális csoportjának köszönhetően – elősegítheti a vas vesén keresztül történő ürülését. Ezt a feltételezést az is erősíti, hogy a HA_D emelkedő dóziséval felszívódott többlet vasat nem találtam meg a vizsgált szervekben (máj, vese, csont, szőr). Felmerül a kérdés, hogy a nem vizsgált, de a vasanyagcserében fontos szerepet játszó egyéb szervekben (lép, vér, izom), nőtt-e meg a vas mennyisége? Amennyiben ez így lenne, akkor a májban is nagyobb vaskoncentrációt kellett volna mérni, hiszen az a szervezet elsődleges vasraktára így a vasfelesleg oda kerül.

A vaskoncentráció – nagy dózisú (0,8%) HA_D-kiegészítés hatására létrejött szignifikáns ($p < 0,05$) – csökkenésében minden bizonnyal szerepet játszott a máj esetében már leírt megfigyelés (Zrally és mtsai. 2008), hogy amennyiben telítetlen a HA szabad fémkötő kapacitása, átveszi a fémeket a szállító- illetve raktározófehérjéktől. Mivel a vesében is jelen van a ferritinhez kötött vas, a HA képes lehet azt leválasztani a ferritinről (Ho és mtsai. 2002), és a vizeletbe juttatni, csökkentve ezáltal a vese vastartalmát.

A vizsgálatok eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy az FA_D és a HA_D egymástól eltérően befolyásolja a bélcsatornából történő vasszorbódást, valamint a máj és a vese vaskoncentrációját. Ez tovább erősíti a feltételezést, mely szerint a humuszanyagokat nem célszerű egységes anyagnak tekinteni, amikor azok biológia hatását vizsgálják.

A réz és a cink felszívódása

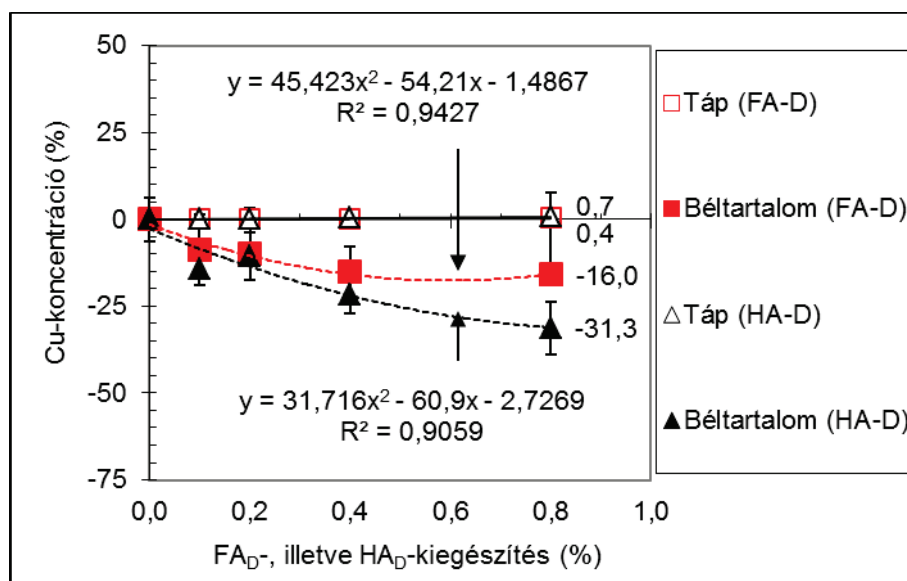
A réz és a cink felszívódásában – hasonlóan a legtöbb mikroelemhez – megkülönböztethetünk aktív és passzív mechanizmust (Bronner és Yost, 1985; Wapnir, 1998). Az aktív transzporttal történő felszívódás helye a vékonybél, főként a duodenum (Davies, 1980; Lönnerdal, 2000). Cousins (1985) szerint az első lépés a fémion egy membránfehérjéhez történő kötődése. Ezután a fehérje vagy chaperon-ként viszi be a fémiont, vagy transzportmolekulaként, a fémionnal együtt jut be a sejtbe. Szakirodalmi adatok alapján valószínűsíthető, hogy a réz és a cink ugyanazon transzportmechanizmussal szívódik fel (Oestricher és Cousins, 1985), így egymásnak antagonistái (Sandstead, 1995).

Hempe és Cousins (1992) szerint a bélhámsejtben e mikroelemek a sejtmembránon való átjutás után egy szállítófehérjéhez kötődnek. A cink esetében ez a fehérje a CRIP (Cysteine-rich Intestinal Protein). A CRIP szerepe, hogy megkösse a citoszolban lévő szabad cinket, védve ezáltal a sejtet valamint, hogy elszállítsa a cinket a bazolaterális membránon át a véráramba (Cousins és Lanningham-Foster, 2000). A sejtben szabadon lévő, a CRIP-hez nem kötött mikroelemeket egy nem specifikus fehérje köti meg – ami cink és réz esetében a metallothionein – amelynek szerepe a cink és a réz homeosztázisának fenntartása (Pattison és Cousins, 1986; Cousins és Lanningham-Foster, 2000).

Ahogy azt Menard és mtsai. (1981) kimutatták, ha nő a takarmány cinktartalma, növekszik a metallothionein szintézisét meghatározó mRNS mennyisége is. A metallothionein-szint növekedése viszont csökkenti a cinkfelszívódást (Hempe és Cousins, 1992). Miután a CRIP-hez kötött fémion eléri a bazolaterális membránt, elválik a szállítófehérjétől és átjut a membránon (Oestricher és Cousins, 1984). A keringésben a cink albuminhoz, a réz pedig cöruoplazminhoz kötötten található (Smith és mtsai., 1979; Hempe és Cousins, 1992) és így szállítódnak a májba, majd a szövetekbe (Cousins, 1985). A legnagyobb mennyiségben, a májban, a vesében, a csontban és a szőrben halmozódnak fel.

Réz

A 23. ábrán az FA_D-nak és a HA_D-nak a réz koncentrációjára kifejtett dóziszfüggő hatását követhetjük nyomon a tápban és a vastagbél tartalomban.



23. ábra. Az FA_D és a HA_D hatása a tápok és a vastagbél tartalom rézkoncentrációjának relatív változására a kontrollhoz (0%) viszonyítva

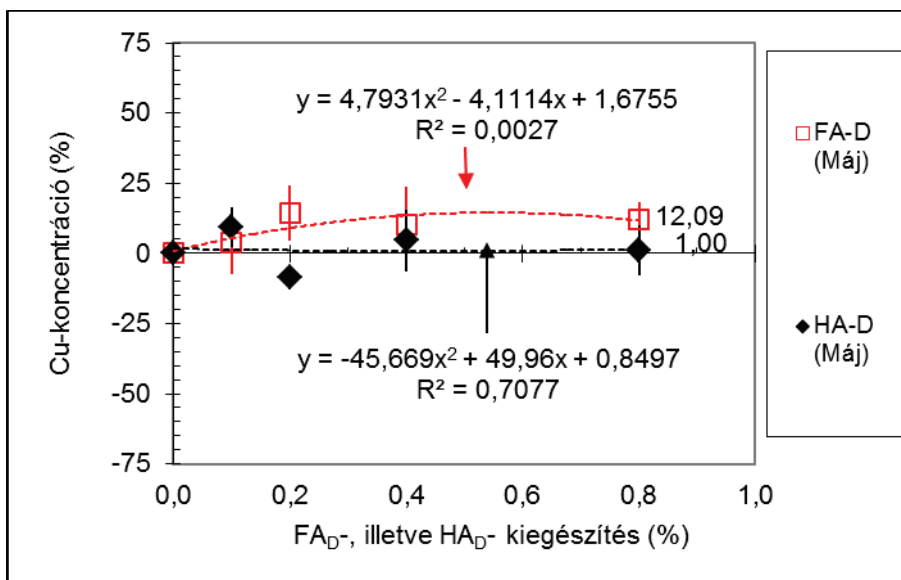
Az ábrán látható, hogy az FA_D és a HA_D – a korábban már leírt kis réztartalmuk következtében – nem befolyásolták lényegesen a tápok rézkoncentrációját. Ugyanakkor mind az FA_D ($r = -0,971$), mind a HA_D ($r = -0,952$) dózistól függően, minden koncentrációban szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a vastagbél tartalom rézkoncentrációját a kontrollhoz képest. Ennek mértéke nagyobb volt a HA_D-s tápokot fogyasztó patkányokban, de egyik dózis esetében sem volt szignifikáns eltérést az FA_D-s és a HA_D-s csoportok adatai között.

Amint azt a vas esetében már leírtam, a kontrollhoz viszonyított koncentrációváltozás indirekt információt ad a FA_D illetve a HA_D rézfelszívódásra kifejtett hatásáról. A 23. ábrán látszik, hogy a HA_D valamennyi dózisban nagyobb mértékben csökkentette a vastagbél tartalom rézkoncentrációját, mint az FA_D.

A szakirodalom alapján (Islam és mtsai., 2005; Zrally és mtsai., 2008) – a fentiekkel ellentétben – azt várhatnánk, hogy a nagy molekulatömegűnek, ezáltal rosszul felszívódónak gondolt és a rezet erősen kötő HA_D (Rashida, 1974) a bélben tartja azt, azaz nem engedi felszívódni. Eredményeink azonban ennek az ellenkezőjét mutatják. Az ellentmondásra a legkézenfekvőbb magyarázat az, amit már a vasnál is ismertettünk.

Az állati szervezetben a réz legnagyobb mennyiségben a májban, a vesében, az izmokban, a csontban, a bőrben és a szőrben fordul elő. Az eredmények azt mutatják, hogy

az FA_D és a HA_D hatására felszívódott többlet réz (a kontrollhoz képest) egy része csak az FA_D esetében volt megtalálható a májban.



24. ábra. Az FA_D és a HA_D hatása a máj réz tartalmának relatív változására a kontrollhoz (0%) viszonyítva

Ezt igazolja, hogy míg minden FA_D-dózis emelte a máj rézkoncentrációját (0,2 és 0,8% esetében a koncentrációemelkedés szignifikáns / $p < 0,05$ / volt, amit a 24. ábra is szemléltet), addig a HA_D esetében nem tapasztaltam eltérést a kontrollhoz képest, holott az majdnem kétszer akkora mértékben csökkentette a vastagbél tartalom rézkoncentrációját, mint az FA_D.

A HA_D dózisa és a májban mért rézkoncentráció között nem tudtam megállapítani pontos összefüggést, ugyanis a 0,1 és 0,2%-os kiegészítés szignifikánsan ($p < 0,05$) bár, de ellentétes irányba befolyásolta a máj rézkoncentrációját, a 0,4 és 0,8%-os dózis pedig nem mutatott szignifikáns ($p < 0,05$) különbséget a kontrollhoz képest (24. ábra). Mivel a többi vizsgált szervben sem tudtam szignifikáns különbséget kimutatni a kontroll- és a kísérleti csoportok között, feltételezhető, hogy a réz egyéb, általam nem vizsgált szervekbe (izom, bőr) került, vagy a vesén keresztül, fulvát- illetve humátkelát formájában távozott.

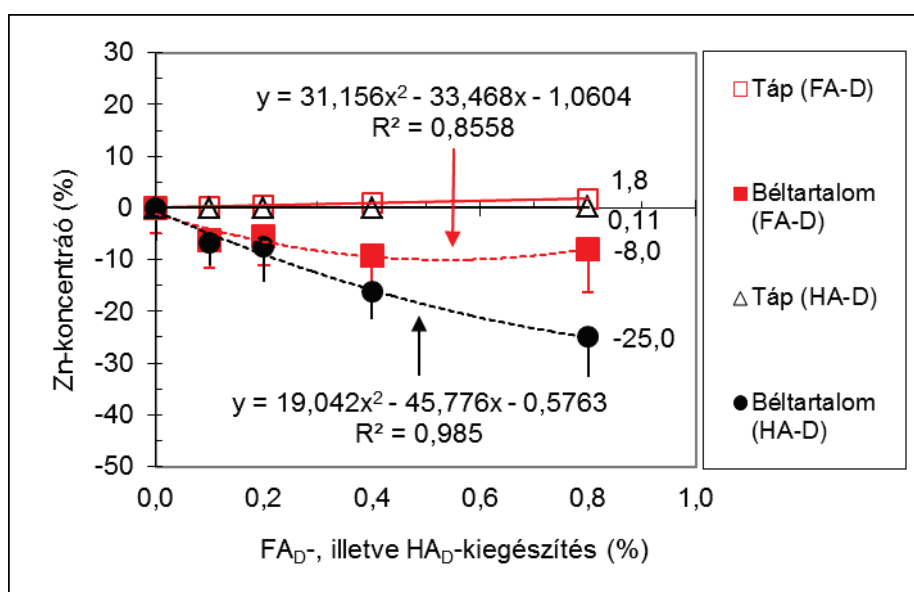
Cink

A cinket a takarmányozási gyakorlatban már jó néhány évtizede használják hozamfokozóként (Herzig és mtsai. 2009). A termelés gazdaságossága, és az állategészségügyi állapot javítása céljából leginkább a cink-oxid alkalmazása terjedt el. A cinkoxid-kiegészítés hátulütője, hogy szennyezheti a környezetet. A kutatók intenzíven keresik azokat a megoldásokat (főleg a cink szerves formában történő bevitelére) amelyekkel kiváltható a szervetlen cink, és csökkenthető a környezet cinkterhelése.

Ebből a megközelítésből érdemes megvizsgálni a FA-t és a HA-t, mint potenciális kelátképző anyagokat. Mind az FA, mind a HA könnyedén köti meg a fémeket (Zn, Cu, Fe,

Cd, Pb, stb.) és szinte végtelen számú fulvát- és humátkomplex létrehozására képesek (Boyd és mtsai., 1981; Senesi és mtsai., 1985; König és mtsai., 1986; Kang és mtsai., 1991; Livens, 1991). Sajnos nagyon kevés olyan közlemény található a szakirodalomban, amely az állati termelésben fontos mikroelemek FA-val, illetve HA-val alkotott kelátjainak hatását vizsgálja (Islam és mtsai., 2005; Herzig és mtsai., 2009.; Zraly és Pisarikova, 2009). Ezért érdemes tanulmányozni az FA és a HA cinkfelszívódásra és az egyes szervek (máj, vese, csont és szőr) cinkkoncentrációjára kifejtett hatását.

A 25. ábrán az FA_D-nak és a HA_D-nak a cink koncentrációjára kifejtett dóziszfüggő hatását követhetjük nyomon a tápban és a vastagbél-tartalomban.



25. Ábra Az FA_D és a HA_D hatása a tápok és a vastagbél-tartalom cinktartalmának relatív változására a kontrollhoz (0%) viszonyítva

Amint azt a vas esetében már leírtam, a kontrollhoz viszonyított koncentráció változása indirekt információt ad az FA_D illetve a HA_D cinkfelszívódásra kifejtett hatásáról.

Az ábrán látható, hogy az FA_D és a HA_D – a korábban már leírt kis cinktartalma következtében – nem befolyásolta lényegesen a tápok cinkkoncentrációját. A kísérletben azt tapasztaltam, hogy a vizsgált anyagok – a kontrollhoz képest – dózistól függően (FA_D: r = -0,93; HA_D: r = -0,99) csökkentették a vastagbél-tartalom cinktartalmát, de ez csak a HA_D esetében volt szignifikáns (p<0,05). Az eredmények tükrében azt mondhatjuk, hogy patkányokban a HA_D növelte hatékonyabban a cink bélből történő felszívódását. Ez azt feltételezi, hogy a HA_D vagy több cinket köt meg és ugyanúgy szívódik fel mint az FA_D vagy nagyobb mértékben szívódik fel annál és ugyanannyi cinket köt meg.

A tapasztalt jelenségre hasonló lehet a magyarázat mint a vas és a réz esetében, azaz, hogy a HA_D egy része felszívódik és kelát formában magával viszi a cinket.

A máj cinktartalmát sem az FA_D sem a HA_D nem befolyásolta szignifikánsan. Hasonló megállapításra jutottak Herzig és mtsai. (2009), akik brojlereken vizsgálták a Na-humátnak (500 mg Na-humát/brojler/nap) a máj cinktartalmára kifejtett hatását. Esetükben a Na-humát cinkkoncentrációja 1,31 mg/kg takarmány volt, ami jóval kisebb az általam vizsgált HA_D cinktartalmánál (8,10 mg/kg takarmány) és töredéke az FA_D cinktartalmának (128,00 mg/kg takarmány). A kutatók azt találták, hogy a Na-humát nem változtatta meg szignifikánsan ($p < 0,05$) a máj cinkkoncentrációját. Az általam kapott eredményekből látszik, hogy ez nagyobb cinktartalmú táp etetése esetén sem várható. Zdenek és mtsai. (2009) választott malacokon tanulmányozták az 1%-os Na-humát kiegészítésének a máj cinktartalmára gyakorolt hatását. Az általuk használt Na-humát 22 mg/kg cinket tartalmazott. A kutatók nem találtak szignifikáns különbséget a malacok májának cinktartalmában. Az általam tapasztaltak megegyeznek Herzig és mtsai. (2009) valamint Zdenek és mtsai. (2009) eredményeivel.

Érdekes megvizsgálni viszont az FA_D-nak a vese cinkkoncentrációjára kifejtett hatását (29. táblázat). Az eredmények azt mutatják, hogy – a 0,2%-ot kivéve – az FA_D minden koncentrációja szignifikáns mértékben ($p < 0,05$) csökkentette a vese cinktartalmát. Sajnos nem állnak rendelkezésre olyan szakirodalmi források, melyek az FA hatását vizsgálták volna a cink vesében mért koncentrációjára, így azokkal nem tudjuk összevetni az eredményeket. Látható az is, hogy a vesében az FA_D ellentétesen befolyásolja a vas (növelte) és a cink (csökkentette) koncentrációját. A kísérlet adatai alapján nem tudok pontos választ adni a jelenségre, de feltételezhetően az FA erősebben köti meg a cinket, mint a vasat és így a glomerulusszűrletből kevesebb cink szívódik vissza a tubulusokban, ami a vese cinkkoncentrációjának csökkenéséhez vezet.

A combcsont vizsgálatok azt tapasztaltam, hogy mind az FA_D (0,8%) mind a HA_D (0,1 és 0,4%) szignifikánsan ($p < 0,05$) csökkentette a minták cinktartalmát (29. és 30. táblázat). Ez az eredmény arra hívja fel a figyelmet, hogy az FA és a HA egyaránt csökkentheti a csontok cinkellátását, ezáltal befolyásolva a csontosodási folyamatokat (Ilich és Kerstetter, 2000). A szakirodalomban található olyan közlemény, amely a humuszanyagok csontosodást elősegítő hatásáról számol be. Kreutz és Schlikekewey (1992) szarvasmarhába ültetett implantátumon HA hatására 16%-os növekedést észleltek a csontosodásban.

Mangán

A mangán a szervezet számára nélkülözhetetlen nyomelem, mely minden szövetben előfordul és kulcsszerepe van a táplálóanyagok metabolizmusában, az immunrendszer fiziológiás működésében, a vércukorszint szabályozásában, a sejtek energiaellátásában, a reprodukciós folyamatokban, a csontnövekedésben és a szabadgyökök hatástalanításában.

Oxidoreduktázok, transzferázok, hidrolázok, liázok, izomerázok és ligázok tartoznak a mangándependens enzimek közé (Aschner és Aschner, 2005).

A takarmányban lévő mangán igen kis mértékben (1-5%) szívódik fel a bélcsatornából (Davis és mtsai. 1993). Izotóppal végzett kísérletben Finley és mtsai. (1994) kimutatták, hogy a táplálékkal bevitt mangán 1,35%-a szívódott fel férfiakban, 3,55%-a nőkben. A felszívódásban tapasztalt különbség okaként a szerzők a férfiak szervezetének nagyobb vastartalmát jelölték meg.

A mangán bélcsatornából történő felszívódását számos tényező befolyásolja. Az egyik legfontosabb ezek közül a takarmány mangántartalma, ami a felszívódáson kívül lényeges hatással van az epével történő ürülésére is (Aschner és Aschner, 2005). Amennyiben nagy a takarmány mangánkoncentrációja, csökken a bélcsatornából történő felszívódás, valamint növekszik az epén és a hasnyálmirigyen keresztül történő ürülés (Finley és Davis, 1999; Dorman és mtsai., 2002).

A mangánfelszívódást a kor, más mikroelemek (pl.: vas) jelenléte, a fitinsav, az aszkorbinsav és egyéb takarmányozási tényezők is befolyásolják (Keen és mtsai., 1986; Davidsson és mtsai., 1991). A vas és a mangán felszívódásában egyaránt fontos szerepet játszik a DMT1 (divalent metal transporter 1) molekula, ez a legvalószínűbb oka a két fém felszívódás szintjén tapasztalt antagonizmusának (Gunshin és mtsai., 1997).

A mangán gamma-globulinhoz, albuminhoz, valamint trivalens (Mn^{3+}) formája – a vasszállító fehérjéhez – ferritinhez kötötten szállítódik a vérben (Aschner és Aschner, 2005).

Az emlősök szöveteinek fiziológiás mangántartalma 0,3-2,9 $\mu\text{g/g}$ között van (Rehnberg és mtsai., 1982; Keen és Zidenberg-Cherr, 1994). Egységnyi tömegre vetítve főleg a nagy energiaigényű (pl.: idegszövet), a sok festékanyagot tartalmazó szövetek (pl.: retina, pigmentált bőr), a csont, a hasnyálmirigy, a máj és a vese tartalmazza a legtöbb mangánt.

A mangán mérhető szöveti koncentrációja – a felszívódás és a kiválasztódás szintjén megvalósuló bipoláris szabályozás miatt – a felvételtől függetlenül meglehetősen állandó. A májsejtek a vérből veszik fel a fehérjéhez kötött mangánt, majd az – az epesavakkal történő konjugáció után – visszajut a bélbe és egy része újra felszívódhat (Schroeder és mtsai., 1996). A mangán a szervezetből elsősorban az epével ürül (Davis és mtsai., 1993; Malecki és mtsai., 1996). A hasnyálmirigyen keresztül ürített és vese által kiválasztott mangán mennyisége egyaránt igen csekély (Davis és mtsai., 1993; Aschner és Aschner, 2005).

Az FA és a HA nagy valószínűség szerint a savas oldalláncaikon képesek megkötni a mangánt és a kötés erőssége függ a környezet pH-jától (Davies és mtsai., 1997). Ebből adódóan az FA és a HA hatással lehet a szervezet mangánhomeosztázisára.

Az eredmények alapján látható (31. és 32. táblázat), hogy a kísérletben az FA_D és a HA_D egyik dózisa sem változtatta meg szignifikánsan a vizsgált minták (táp, vastagbél-tartalom, máj, vese, csont és szőr) mangántartalmát. A májban és a vesében mért

mangánkoncentrációk hasonló tartományban vannak, mint amit Sakai és mtsai. (2003) mértek patkányokban. A femur esetében kapott értékek azonban jóval nagyobbak (10x-es), mint a Sakai és mtsai. (2003) által mértek. A különbség okára nem tudok választ adni, mivel a vizsgálatokban résztvevő állatok mindkét esetben 3 hetes választási patkányok voltak, valamint a kísérlet időtartama és a táp is megegyezett (AIN 93G).

Ezzel ellentétben Zraly és Pisarikova (2009) megfigyelték, hogy amikor 21 napig, 1% nátriumhumát-kiegészítésű takarmányt etettek sertésekkel, szignifikánsan kisebb mangánkoncentráció volt mérhető a májban ($p < 0,01$) és a vesében ($p < 0,05$), annak ellenére, hogy az általuk használt takarmány Mn-koncentrációja (104,5 mg/kg) mintegy tízszer nagyobb volt, mint a kísérletünkben használt patkánytápé (11,0-11,4 mg/kg). Ez arra hívja fel a figyelmet, hogy a 0,8%-ot meghaladó kiegészítés (1%) következtében a HA olyan mértékben kötheti meg a mangánt, hogy az még a takarmány tízszeres mangándózisa esetén is a szervek mangántartalmának csökkenéséhez vezethet. A kérdést tovább árnyalja az a tény, hogy a kutatók más forrásból (láp) előállított HA-t használtak, ami alapján feltételezhetjük, hogy a molekulatömeg és a fémkötésben résztvevő aktív csoportok száma is eltérő lehetett (Shinozuka, 2003).

Összefoglalva megállapítható, hogy

- mind az FA_D , mind a HA_D igen jól felszívódott,
- az FA_D és a HA_D egyaránt jelentős vasforrásnak tekinthető,
- míg az FA_D esetében megfigyelhető a vas homeosztázisának unipoláris (felszívódás szintjén történő) szabályozása (a vastagbél-tartalom dózissal arányosan növekedő vaskoncentrációja, valamint a máj és a vese közel állandó vastartalma) addig a HA_D vonatkozásában ez nem tapasztalható, azaz a HA_D -val bevitt többlet vas felszívódik a bélcsatornából,
- a HA_D -val bevitt és felszívódott többletvas nem mutatható ki a májban és a vesében, sőt csökken azok vaskoncentrációja, ami arra utal, hogy amennyiben még nem telített a felszívódott HA_D vaskötő kapacitása, akkor a szervekből (pl: máj, vese) vasat vonhat el,
- ellentétben a vassal a réz és a cink felszívódását mindkét tesztanyag dóziszfüggően javította, a HA_D esetében ez a hatás 2-3-szor hatékonyabb volt,
- mindkét vizsgálati anyag csökkentette a csont cinktartalmát.

9. A kísérletek eredményeinek összefoglaló értékelése

A fulvosav és a huminsav gazdasági paraméterekre kifejtett hatásából levonható megállapítások összefoglalása:

- az intézeti körülmények között tartott és ovalbuminnal immunizált SPF patkányokban – a kontrollhoz viszonyítva – sem a FA_D sem a HA_D nem befolyásolta szignifikáns mértékben a takarmányfelvételt, a súlygyarapodást, ellenben a FA_D szignifikáns mértékben rontotta a fajlagos takarmány-felhasználást,
- a HA_D hatása egyik vizsgált paraméterre vonatkozóan sem volt dóziszfüggő,
- a kísérlet 7-14. napja között igen erős (R=-0,996) polinomiális összefüggés volt a FA_D dózisa és a fajlagos takarmány-felhasználás között, mely szerint a 0,4%-os bekeverési szint mutatkozott a legjobbnak,
- a FA_D és a HA_D takarmányfelvételre és testsúlyra kifejtett hatása szignifikánsan eltérő, ugyanis a HA_D-kiegészítésben részesült állatok takarmányfelvétele és testsúlya szignifikánsan nagyobb volt, mint a FA_D csoportoké, ami alapján valószínűsíthető, hogy a FA_D étvágycsökkentő és/vagy ízrontó.

A kísérlet adatai arra utalnak, hogy a szakirodalomban található, humuszanyagokkal kapcsolatos számos ellentmondás egyik fő oka a vizsgált anyagok eltérő FA:HA-arányában keresendő. Mindezek mellett az alábbi okok játszhatnak még fontos szerepet:

- a kísérletekben használt humuszanyagok különböző dóziszai,
- a vizsgálati anyagok adagolásának időtartama,
- a kísérletekben használt állatfaj,
- az eltérő környezeti terhelés (főleg intézeti és nagyüzemi vizsgálatok között),
- az etetés időtartama alatt az immunizálás megléte vagy annak hiánya.

A fulvosav és a huminsav immunválaszra kifejtett hatásából levonható megállapítások összefoglalása:

- mind az FA_D mind a HA_D kifejezett immunstimuláns hatást mutatott,
- az ovalbumin ellen adott humorális immunválasz szempontjából a 0,4%-os FA_D- és HA_D-kiegészítés bizonyult az optimális koncentrációnak,
- az FA_D- és a HA_D egyaránt a humorális immunválaszt fokozta.

A FA_D- és a HA_D immunstimuláns hatása a gyakorlati takarmányozás számára igen nagy jelentőséggel bírhat, hiszen patogénterhelésnek kitett állományokban a humuszanyagok erős humorális immunstimuláns hatása hozamnövekedést is eredményezhet. Feltehetően erre vezethető vissza a humuszanyagok szakirodalomban közölt (Parks, 1988; Bailey és

mtsai., 1996; Eren és Deniz, 2000; Kocabagli és Alp 2002), nagyüzemi kísérletekben mért hozamfokozó hatása.

A fulvosav és a huminsav bélfőrára kifejtett hatásából levonható megállapítások összefoglalása:

- mind a FA_D, mind a HA_D kedvezően befolyásolta a vastagbélfőra egyensúlyát, mivel két kitevővel csökkentette a maradványflórához tartozó szulfitredukáló anaerob csírák számát a kontrollhoz képest,
- a HA_D-tartalmú táp kedvezően módosította a bélfőra egyensúlyi állapotát azáltal, hogy növelte a tejsavtermelő/coliform arányát,
- a HA_D tartalmú tápnek a tejsavtermelő/coliform arányára kifejtett hatása dóziszfüggő volt, e tekintetben a 0,2%-os koncentráció bizonyult a legkedvezőbbnek.

A fulvosav és a huminsav összantioxidáns-kapacitásra (FRAP) és májra (AST aktivitás) kifejtett hatásából levonható megállapítások összefoglalása:

- sem a FA_D sem a HA_D nem változtatta meg a vérplazma összantioxidáns-kapacitását,
- az AST adatai és a szövettani vizsgálat alapján a tesztanyagoknak nem volt májkárosító hatása,
- egyik vizsgált paraméter esetében sem volt dóziszfüggő hatás, ami arra utal, hogy az FA_D és a HA_D – 0,1-0,8%-os tartományban alkalmazva a tápokban – e tekintetben biztonságosnak tekinthetők.

A fulvosav és a huminsav pajzsmirigyre (TSH-, T3-, T4-plazmakoncentráció, T3/T4-hányados) kifejtett hatásából levonható megállapítások összefoglalása:

- sem a FA_D, sem a HA_D nem befolyásolta szignifikáns mértékben a vérplazma TSH-, T3- és T4-koncentrációját, valamint a T4/T3-hányadost,
- a FA_D-kiegészítés alkalmazott dózisa ugyanakkor igen szoros pozitív korrelációban (R=0,991) voltak a vérplazma TSH-szintjével, és negatívban a T₄/T₃-hányadossal (R=-0,966), azaz a szakirodalomban közölt hipotireoid hatásért nagy valószínűséggel a humuszanyagok FA frakciója felelős,
- a FA_D hatása dóziszfüggőnek tekinthető.

A fulvosavnak és a huminsavnak a vastagbél-tartalomra, valamint egyes szervek (máj, vese, csont, szőr) Fe-, Cu-, Zn- és Mn koncentrációjára kifejtett hatásából levonható megállapítások összefoglalása:

- mind a FA_D, mind a HA_D igen jól felszívódott,

- a FA_D és a HA_D egyaránt jelentős vasforrásnak tekinthető,
- a HA_D-vel bevitt és felszívódott többletvas nem mutatható ki a májban és a vesében, sőt csökken azok vaskoncentrációja, ami arra utal, hogy – amennyiben még nem telített a felszívódott HA_D vaskötő kapacitása – vasat vonhat el a szervekből (pl: máj, vese),
- ellentétben a vassal, a réz és a cink felszívódását mindkét tesztanyag dóziszfüggően javította, a HA_D esetében ez a hatás 2-3-szor hatékonyabb volt,
- mindkét vizsgálati anyag csökkentette a csont cinktartalmát.

10. Új tudományos eredmények

- Kísérleteink alapján kijelenthetjük, hogy az FA-t és a HA-t – a különböző vizsgálati paraméterekre kifejtett eltérő hatásuk miatt – nem szabad egységes anyagnak tekinteni és hatásukat mindenképp célszerű külön-külön vizsgálni.
- Mindkét tesztanyag nagyon erős és tartós humorális immunstimuláns hatású, ami az immunalapú hozamfokozás szempontjából jelentős lehet a nagyüzemi állattartásban.
- A HA-tartalmú táp kedvezően módosítja a bélflóra egyensúlyi állapotát azáltal, hogy csökkenti a szulfitredukáló anaerob csírák számát és növeli a tejsavtermelő/coliform baktériumok arányát.
- A humuszanyagok szakirodalomban is leírt enyhe hipotireoid hatása az FA-hoz köthető.
- Nem tartható az a tudományos nézet, mely szerint a HA a humuszanyagok minden esetben nagy molekulatömeg és rosszul felszívódó frakciója.
- Amennyiben még nem telített a felszívódott HA vaskötő kapacitása, akkor – jelentős vastartalma ellenére – vasat vonhat el a szervekből (pl: máj, vese).
- A réz és a cink felszívódását – ellentétben a vassal – mindkét tesztanyag dóziszfüggően javítja, a HA esetében ez a hatás 2-3-szor hatékonyabb.

11. Irodalomjegyzék

Adachi, H.; Konishi, K.; Toriizuka, K.; Horikoshi, I., 1987: The in vitro effects of tannic acid on rat liver mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **35**, 1176-82.

Andersen, S.; Hvingel, B.; Kleinschmidt, K.; Jørgensen, T.; Laurberg, P., 2005: Changes in iodine excretion in 50–69-year-old denizens of an Arctic society in transition and iodine excretion as a biomarker of the frequency of consumption of traditional Inuit foods. *Am. J. Clin. Nutr.* **81**, 656-663.

AOAC, 1990: Official Methods of Analysis, 15th edn. Association of Official Analytical Chemists. Herlich, K. (ed.) Arlington, VA. USA.

Appel, M. J.; Kuper, C. F.; Woutersen, R. A., 2001: Disposition, accumulation and toxicity of iron fed as iron (II) sulfate or as sodium iron EDTA in rats. *Food Chem. Toxicol.* **39**, 261-269.

Aschner, J. L.; Aschner, M., 2005: Nutritional aspects of manganese homeostasis. *Mol. Aspects Med.* **26**. 353-362.

Atalay, Y. B.; Carbonaro, R. F.; Di Toro, D. M., 2009: Distribution of proton dissociation constant for model humic and fulvic acid molecules. *Environ. Sci. Technol.* **43**, 3626-3.

Auroma, O. I., 1994: Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* **32**, 671-683.

Bailey, C. A.; White, K. E.; Donke, S. L., 1996: Evaluation of Menefee Humate™ on the performance of broilers. *Poult. Sci.* 75 (Suppl. 1): 84. (Abstr.).

Benzie, I. F. F.; Strain J. J., 1996: The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a measure of „Antioxidant Power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.

Béres, T.; Kabdebó, S.; Kovács, F.; Nemeséri, L.; Székely, A.; Vízny, L., 1957: Vizsgálatok a fulvosav terápiás alkalmazásáról, különös tekintettel májvédő hatására. *Magy. Állatorv. Lapja.* **15**, 351-352.

Boyd, S. A.; Sommers, L. E.; Nelson, D. W.; West, D. X., 1981: The mechanism of copper (II) binding by humic acid: an electron spin resonance study of a copper (II)-humic acid complex and some adducts with nitrogen donors. *Soil Sci. Soc. of Am. J.* **45**, 745-749.

Brandt, H., 1964: Die Behandlung degenerativer Erkrankungen der Wirbelsäule und der Gelenke mit salizylierten Huminsäurebädern. *Fortschr. Med.* **82**, 110.

Bronner, F.; Yost J. H., 1985: Saturable and nonsaturable copper and calcium transport in mouse duodenum. *Am. J. Physiol.* **249**, 108-112.

Buczko, W.; Malinowska, M. H.; Pietraszek, M. H.; Pawlak, D.; Chabielska, E., 1993: Influence of tolpa peat preparation on haemostasis in rats. *Acta Pol. Pharm.* **6**, 507-511.

Burges, N. A.; Hurst, H. M.; Walkden B., 1964: The phenolic constituents of humic acid and their relationship to the lignin of the plant cover. *Geochim. Cosmochim. Acta* **28**, 1547-1554.

Ceylan, N.; Ciftici, I., 2002: The effects of some alternative feed additives for antibiotic growth promoters on the performance and gut microflora of broiler chicks. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* **27**, 727-733.

Chodan, J.; Sobieraj, W., 1966: The effect of various humic fractions of peat on *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Acta Microbiol. Pol.* **15**, 267-72.

Choudhry, G. G., 1981: Humic substances:Part I: Structural aspects. *Toxic Environ. Chem.* **4**, 209-259.

Cloete, T.E.; Swart, H.; Cronje, I. J.; Dekker, J., 1990: Oxidized coal products as industrial bactericides. Third International Symposium on Gas, Oil, Coal and Environmental Biotechnology. New Orleans, Louisiana, USA, 3-5 December 1990.

Cooksey, R. C.; Gaitan, E.; Lindsay, R. H.; Hill, J. B.; Kelley, K., 1985: Humic substances, a possible source of environmental goitrogens. *Org. Geochem.* **8**, 77-80.

Cousins, R. J., 1985: Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Physiol. Rev.* **65**, 238-309.

Cousins, R. J.; Lanningham-Foster, L., 2000: Regulation of cysteine-rich intestinal protein, a zinc finger protein, by mediators of the immune response. *J. Infect. Dis.* **182**, 81-84.

CVMP (Comitee for Veterinary Medicinal Products), 1999: Humic acid and their sodium salts (summary report). The European Agency for the evaluation of Medicinal Products. EMEA/MRL/554/99-FINAL February 1999.

David, M. F.; Anderson, G. J., 2005: Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, 631-635.

Davidsson, L.; Cederblad, A.; Lonnerdal, B.; Sandstrom, B., 1991: The effect of individual dietary components on manganese absorption in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **54**, 1065-1070.

Davis, C. D.; Zech, L.; Greger, J. L., 1993: Manganese metabolism in rats: an improved methodology for assessing gut endogenous losses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **202**, 103-108.

Davies, N. T., 1980: Studies on the absorption of zinc by rat intestine. *Br. J. Nutr.* **43** 189-203.

Davies J.; Fataftah, A.; Cherkasskiy, A.; Ghabbour, E. A.; Radwan, A.; Jansen, S. A.; Kolla, S.; Paciolla, M. D.; Sein, L. T. Jr.; Buermann, W.; Balasubramanian, M.; Budnick, J.; Xing, B., 1997: Tight metal binding by humic acids and its role in biomineralization. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **21**, 4047-4060.

Delange, F., 1988: The role of goitrogenic factors distinct from iodine deficiency in the etiology of goiter. *Annales d'Endocrinologie* **49**, 302-305.

Donovan, A.; Brownlie, A.; Zhou, Y.; Shepard J.; Pratt, S. J.; Moynihan, J.; Paw, B. H.; Drejer, A.; Barut, B.; Zapata, A.; Law, T. C.; Brugnara, C.; Lux, S. E.; Pinkus, G. S.; Pinkus, J. L.; Kingsley, P. D.; Palis, J.; Fleming, M.D.; Andrews, N. C.; Zon, L. I., 2000: Positional cloning of zebrafish Ferroportin 1 identifies a conserved vertebrate iron exporter. *Nature* **403**, 778-781.

Dorman, D. C.; Struve, M. F.; James, R. A.; Wong, B. A., 2002: Brain manganese concentrations in rats following manganese tetroxide inhalation are unaffected by dietary manganese intake. *Neurotoxicology* **23**, 185-195.

Dos Santos, A.; Botero, W. A.; Bellin, I. C.; Oliveira, L. C.; Rocha, J. C.; Mendonca, A. G. R.; Godinho, A. F., 2007: Humic substances and metallic ions: a selective study of humic substances and their possible therapeutic application. *J. Bras. Chem. Soc.* **4**, 824-830.

Eichelsdörfer, D., 1976: Moor in der Heilkunde. In: Moor- und Torfkunde (K. Göttlicg, ed.). Schweizerbart, Stuttgart, Deutschland.

Enviromate, T. M., 2002: Effects of humic acid on animals and humans (literature review and current research). Effects of humic acid. Enviromate Inc. 8671 Boat Club Road, Forth Worth, Texas 76179. USA. <http://www.enviromateinc.com/effect.sha.asp>

Eren, M.; Deniz, G.; Gezen, S. S.; Türkmen, I. İ., 2000: Broiler yemlerine katılan humatların besi performansı, serum mineral konsantrasyonu ve kemik külüzernie etkileri. *Ankara Üniv. Vet. Fak. Derg.* **47**, 255-263.

Finley, J. W.; Davis, C. D., 1999: Manganese deficiency and toxicity: are high or low dietary amounts of manganese cause for concern? *Biofactors.* **10**, 15-24.

Finley, J. W.; Johnson, P. E.; Johnson, L. K., 1994: Sex affects manganese absorption and retention by humans from a diet adequate in manganese. *Am. J. Clin. Nutr.* **60**, 949-955.

Frazer, D. M.; Anderson, G. J., 2005: Iron imports. I. Intestinal iron absorption and its regulation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **289**, 631-645.

Fraioli, A; De Angelis Curtis, S.; Ricciuti, G.; Serio, A.; D'Ascenzo, G., 2001: Effect of water of Anticolana Valley on urinary sediment of renal stone formers. *Clin. Ter.* **152**, 347-51.

Gaitan, E., 1984: Endemic Goiter in Western Columbia. Ecology of Disease (Bourne, A. and Howe, M. ed.) Pergamon Press, Oxford, UK.

Gaitan, E.; Merino, H.; Rodriguez, G.; Medina, P.; Meyer, J. D.; DeRouen, T. A.; MacLennan R., 1978: Epidemiology of endemic goiter in western Colombia. *Bull., WHO* **56**, 403-416.

Galambos, I., 2006: Kútvizek huminsav- és arzénmentesítése. *Doktori (PhD) értekezés*

Gedek, B., 1989: Intestinal flora and bioregulation. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **8**, 417-437.

Greene, L. W.; Cole, A., 2000: Efficient waste and odor management for feedlots.- USDA/ARS. The Agriculture Program, Texas A & M University System, AGCOM 5-1-00. <http://agroprogram.tamu.edu/>; press release, May, 2000.

Gunshin, H.; Mackenzie, B.; Berger, U. V.; Gunshin, Y.; Romero, M. F.; Boron, W. F.; Nussberger, S.; Gollan, J. I.; Hediger, M. A., 1997: Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. **338**, 482-488.

Haanel, B. F., 1924: Facts about peat. In: Mines Branch Publ no. 614, Can. Dept. Mines, Ottawa, Canada.

Hadipour, H. A.; Allameh, A.; Kazemnejad, A., 2003: Relationship between antioxidant power of plasma with lipid peroxide formation in plasma and liver damages caused by overdose of vitamin K1 in adult and weanling rats. *Acta Med. Iranica*. **41**, 207-213.

Hallberg, L.; Hulten, L.; Gramatkovski, E., 1997: Iron absorption from the whole diet in men. How effective is the regulation of iron absorption? *Am. J. Clin. Nutr.* **66**, 347-356.

Hempe, J. M.; Cousins, R. J., 1992: Cysteine-rich intestinal protein and intestinal metallothionein: an inverse relationship as a conceptual model for zinc absorption in rats. *J. Nutr.* **122**, 89-95.

Herzig, I.; Hampl, J.; Docekalova, V. A.; PISAŘIKOVA, B.; VICEK, J. V., 1994: The effect of sodium huminate on cadmium deposition in the organs of chickens. *Vet. Med. (Praha)*. **39**, 175-185.

Herzig, I.; PISAŘIKOVA, B.; Kursa, J.; Suchy, P., 2000: Utilisation of iodine from different sources in pigs. *Archiv für Tierernährung* **53**, 179-189.

Herzig, I.; PISAŘIKOVÁ, B.; KURSKA, J.; BENDOVÁ, J., 2001: Effect of humine compounds on iodine utilisation and retention and on the function of thyroid gland. *Vet. Med. Czech* **46**, 61-64.

Herzig, I.; Navrátilova, M.; Totusek, J.; Suchy, P.; Vecerek, V.; Blahová, J.; Zralý, Z., 2009: The effect of humic acid on zinc accumulation in chicken broiler tissues. *Czech J. Anim. Sci.* **3**, 121-127.

Ho, K. J.; Liu, T. K.; Huang, T. S.; Lu, F. J., 2002: Humic acid mediates iron release from ferritin and promotes lipid peroxidation in vitro: a possible mechanism for humic acid-induced cytotoxicity. *Arch. Toxicol.* **77**, 100-109.

Horváth, S., 1980: Mikrobiológiai praktikum, Tankönyvkiadó, Bp. 1980. T40, 477. old.

Hosse, M.; Wilkinson, K. J., 2001: Determination of electrophoretic mobilities and hydrodynamic radii of three humic substances as a function of pH and ionic strength. *Environ. Sci. Technol.* **35**, 4301-4306.

Huang, T. S.; Fung J. L., 1991: Iodine binding by humic acid. *Environ. Toxicol. Chem.* **10**, 179-184.

Huang, T. S.; Lu, F.J.; Tsai, C.W.; Chopra, I. J., 1994: Effect of humic acids on thyroidal function. *J. Endocrin. Invest.* **17**, 787-791.

Huck, T. A.; Porter, N.; Bushell, M. E., 1991: Effects of humates on microbial activity. *J. Gen. Microbiol.* **10**, 2321-2329.

Hunt, J. R.; Zito, C. A.; Johnson, L. K., 2009: Body iron excretion by healthy men and women. *Am. J. Clin. Nutr.* **89**, 1792-1798.

HuminTech., 2004: Huminfeed – Tierfutterzusätze und Veterinär Medizin und Huminsäuren Basierende Produkte. Humintech® Humintech GmbH, Heerdter Landstr. 189/D, D-40549 Düsseldorf, Germany. <http://www.fulvic.de/049/animalfeeds/products/huminfeed.html>

Ilich, J. Z.; Kerstetter, J. E., 2000: Nutrition in bone health revisited: a story beyond Calcium. *J. Am. Coll. Nutr.* **19**, 715-737.

Ioschenko, S. E., 1986: Effect of humic and fulvic acids of sapropel on the NADH oxidase activity of the liver mitochondria. *Vopr. Kurortol Fizioter. Lech. Fiz. Kult.* **5**, 29-32.

Islam, K. M. S.; Schumacher, A.; Gropp J. M., 2005: Humic acid substances in animal agriculture. *Pakistan J. Nutr.* **4**, 126-134.

Iubitskaia, N. S.; Ivanov, E. M., 1999: Sodium humate in the treatment of osteoarthritis patients. *Vopr. Kurortol. Fizioter. Lech. Fiz. Kult.* **5**, 22-24.

Jolley, R. L.; Gaitan, E.; Lee, N. E.; Lindsay, R. H.; Cooksey, R. C.; Hill, J. R.; Kelley, K., 1983: Resorcinol, a potent antithyroid compound detected in the water supply of a Colombian district with endemic goiter. *J. Am. Chem. Soc. (Div. Environ. Chem.)* **23**, 179-182.

Jooné, G. K.; Dekker, J.; van Rensburg, C. E. J., 2003: Investigation of the immunostimulatory properties of oxihumate. *Z. Naturforsch.* **58**, 263-267.

Jurado, R. L., 1997: Iron, Infections, and Anemia of Inflammation. *Clin. Infect. Dis.* **25**, 888-895.

Kang, Y.; Yamada, H.; Kyuma, K.; Hattori, T.; Kigasawa, S., 1991: Selenium in soil humic acid. *Soil Sci. a. Plant Nutr.* **37**, 241-248.

Karaglou, M.; Macit, M.; Esenbuga, N.; Durdag, H.; Torgut, L.; Bilgin, C. Ö., 2004: Effect of supplemental humate at different levels on the growth performance, slaughter and carcass traits of broilers. *Int. J. Poult. Sci.* **3**, 406-410.

Karasová, J. Z., Hnídková, D.; Pohanka, M.; Musílek, K.; Chilcott, R. P., Kuca, K., 2012: Pharmacokinetics of acetylcholinesterase reactivator K203 and consequent evaluation of low molecular weight antioxidants/markers of oxidative stress. *J. Appl. Biomed.* **10**, 71-78.

Kátai, J.; Zsuposné Oláh, Á.; Sándor, Zs., 2008: Talajtani ismeretek www.agr.unideb.hu/ktvbsc/dl2.php?dl=20/3_eloadas.ppt

Keen, C. L.; Zidenberg-Cherr, S., 1994: Manganese toxicity in humans and experimental animals. In: (Klimis-Tavantzis, D. J., Ed.) *Manganese in Health and Disease*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 193-205.

Keen, C. L.; Bell, J. G.; Lonnerdal, B., 1986: The effect of age on manganese uptake and retention from milk and infant formulas in rats. *J. Nutr.* **116**, 395-402.

Keyser, P.; Pujar, B.J.; Eaton, R. W.; Ribbons, D. W., 1976: Biodegradation of the phthalates and their esters by bacteria. *Environ. Health Perspect.* **18**, 159-166.

Klöcking, R., 1994: Humic substances as possible therapeutics. In: Humic Substances in the Global Environment and Implications on Human Health (Sensei N. and Milano T. M., eds.) Elsevier Science B. V. Amsterdam, The Netherlands.

Knocking, R., 1991: Interaction of humic acids and humic acid like polymers with herpes simplex virus type 1. *Humic substances in the Aquatic and Terrestrial Environment, Berlin*. pp: 408-412.

Kocabagli, N.; Alp, M.; Acar, N.; Kahraman, R., 2002: The effects of dietary humate supplementation on broiler growth and carcass yield. *Poultry Sci.* **81**, 227-230.

König, N.; Baccini, P.; Ulrich, B., 1986: Der einfluss der natürlichen organischen substanzen auf die metallverteilung zwischen boden und bodenlösung in einem sauren waldboden. *Z. Pflanz. Bodenkunde* **149**, 68-62.

Kreutz, B.; Schlikekewey, W., 1992: Effects of Implanted bovine calcium hydroxyapatite with humate. *Arch. Orthop. Trauma Surg.* **5**, 259-264.

Kulaksiz, H.; Theilig, F.; Bachmann, S.; Gherke, S. E.; Rost, D.; Janetzko, A.; Cetin, Y.; Stremmel, W., 2005: Ther iron-regulatory peptide hormone hepcidin: expression and cellular localization in the mammalian kidney. *J. Endocrinol.* **184**, 361-370.

Laub, R., 1995: The chemically induced inhibition of HIV-1 replication. Laub BioChem Corp., January 1995. <http://www.laubchem.com>

Laub, R., 1998a: Acute systemic toxicity studies of natural product and synthetic humates. Laub BioChem Corp., August 1998. <http://www.laubchem.com>

Laub, R., 1998b: The chemically induced inhibition of HSV infection. Laub BioChem Corp., August 1998. <http://www.laubchem.com>

Laub, R., 2000: Laub developing humate with anti-HIV, HSV, HPV and other antiviral activity. Biotechnology Information Institute, February 2000. Antiviral Drug and Vaccine Development Information, Vol. 12, No. 2. ISBN 0897-9871

Livens, F. R., 1991: Chemical reactions of metals with humic material. *Environ. Pollut.* **70**, 183-208.

Lotosh, T. D., 1991: Experimental bases and prospects for the use of humic acid preparations from peat in medicine and agricultural production. *Nauchnye Doki. Vyss. Shkoly Biol. Nauki*. **10**, 99-103.

Loveley, D. R.; Coates, I. D.; Blunt-Harris, E. L.; Phillips, E. I. P.; Woodward, I. C., 1996: Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature* **382**, 445-448.

Lönnerdal, B., 2000: Dietary factors influencing zinc absorption. *J. Nutr.* **130**, 1378-1383.

Lynch, S. R.; Skikne, B. S.; Cook, J. D., 1989: Food iron absorption in idiopathic hemochromatosis. *Blood* **74**, 2187-2193.

Mackey, B. M.; Derrick, C. M., 1979: Contamination of the Deep Tissues of Carcasses by Bacteria Present on the Slaughter Instruments or in the Gut. *J. Appl. Microbiol.* **46**, 355-366.

Magnusson, B.; Bjorn-Rasmussen, E.; Hallberg, L.; Rossander, L., 1981: Iron absorption in relation to iron status. *Scand. J. Haemat.* **27**, 201-208.

Malecki, E. A.; Radzanowski, G. M.; Radzanowski, T. J.; Gallaher, D. D.; Greger, J. L., 1996: Biliary manganese excretion in conscious rats is affected by acute and chronic manganese intake but not by dietary fat. *J. Nutr.* **126**, 489-498.

Masilinski, C.; Fogel, W. A.; Andrzejewski, W., 1993: An examination of humate stimulated liver functions. *Acta Pol. Pharm.* **4-5**, 413-416.

Mcdonald, S.; Bishop, A. G.; Prenzler, P. D.; Roband, S. K., 2004: Analytical chemistry of freshwater humic substances. Review. *Anal. Chim. Acta* **527**, 105-124.

McKie, A. T.; Marciani, P.; Rolfs, A.; Brennan, K.; Wehr, K.; Barrow, D.; Miret, S.; Bomford, A.; Peters, T. J.; Farzaneh, F.; Hediger, M. A.; Hentze, M. W.; Simpson, R. J., 2000: A novel duodenal iron-regulated transporter IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. *Mol. Cell* **5**, 2090-2093.

Menard, M. P.; McCormick, C. C.; Cousins, R. J., 1981: Regulation of intestinal metallothionein biosynthesis in rats by dietary zinc. *J. Nutr.* **111**, 1353-1361.

Meyer, J.; Gaitan, E.; Merino, H.; DeRouen, T. A., 1978: Geologic implications in the distribution of endemic goiter in Colombia, S. A. *Int. J. Epidemiol.* **7**, 25-30.

Mosley, R., 1996: Field trials of dairy cattle. Non published research. Enviromate, Inc. August 1996.

Nakhaee, A.; Bokaeian, M., Saravani, M.; Farhangi, A.; Akbarzadeh, A., 2009: Attenuation of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats by *Eucalyptus globulus*. *Indian J. Clin. Biochem.* **24**, 419-425.

Nicolas, G.; Bennoun, M.; Devaux, I.; Beaumont, C.; Grandchamp, B.; Kahn, A.; Vaulont, S., 2001: Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 8780-8785.

Nochta, I.; Tuboly, T.; Halas, V.; Babinszky L., 2008: Effect of different levels of mannan-oligosaccharide supplementation on some immunological variables in weaned piglets. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **93**, 496-504.

Oestreicher, P.; Cousins, R. J., 1984: Zinc transport by basolateral membrane vesicles from rat small intestine. (abstr.) *Federation Proc.* **43**, 4646.

Oestreicher, P.; Cousins R. J., 1985: Copper and zinc absorption in the rat: mechanism of mutual antagonism. *J. Nutr.* **115**, 159-166.

Parks, C. W., 1998: The use of Menefee Humate™ in typical and low-crude protein diets for turkey toms and in the bioremediation of petroleum contaminated soil amended with poltry litter as a co-substrate and nutrient source. Master's Thesis. North Carolina State University, Raleigh, NC., USA.

Parker, D.; Auvermann, B.; Greene, W., 2001: Effect of chemical treatments, ration composition and feeding strategies on gaseous emissions and odor potential of cattle feedyards. Pre-publication Texas A&M Extension Service, December 2001. TAMU Ag Research and Extension Ctr. Amarillo, TX. USA.

Parris, G. E., 1980: Covalent binding of aromatic amines to humates. 1. Reactions with carbonyls and quinones. *Environ. Sci. Technol.* **14**, 1099-1106.

Pattison, S. E.; Cousins, R. J., 1986: Zinc uptake and metabolism by hepatocytes. *Fed. Proc.* **45**, 2805-2809.

Pena-Méndez, E. M.; Havel, J.; Patocka, J., 2005: Humic substances – compounds of still unknown structure: application in agriculture, industry, environment, and biomedicine. *J. Appl. Biomed.* **3**, 13-24.

Perminova, I. V.; Frimmel, F. H.; Kovalevskii, D. V.; Abbt-Braun, G.; Kudryavtsev, A. V.; Hesse, S., 1998: Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances. *Water Res.* **32**, 872-881.

Rashida, M. A., 1974: Absorption of metals on sedimentary and peat humic acid purchase. *Chem. Geol.* **13**, 115-123.

Rehnberg, G. L.; Hein, J. F.; Carter, S. D.; Linko, R. S.; Laskey, J. W., 1982: Chronic manganese oxide administration to preweanling rats: manganese accumulation and distribution. *J. Toxicol. Environ. Health* **6**, 217-226.

Renz, H.; Bradley, K.; Larsen, G. L.; McCall, C.; Gelfand E. W., 1993: Comparison of the allergenicity of ovalbumin and ovalbumin peptide 323–339. Differential expansion of V beta-expressing T cell populations. *J. Immunol.* **151**, 7206-13.

Riede, U. N.; Zeck-Kapp, G.; Freudenberg, N.; Keller, H. U.; Seubert, B., 1991: Humate induced activation of human granulocytes. *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* **1**, 27-34.

Sandstead, H. H., 1995: Requirements and toxicity of essential trace elements, illustrated by zinc and copper. *Am. J. Clin. Nutr.* **61**, 621-740.

Schiller, F.; Klöcking, R.; Wutzler, P.; Färber, I., 1979: Tropical ammonium humate treatment of human HSV infections. Preliminary clinical results. *Dermatol. Monatsschr.* **165**, 505-509.

Schneider, J.; Weiss, R.; Manner, C.; Kary, B.; Werner, A.; Seubert, B. J.; Riede, U. N., 1996: Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: Mechanism of inhibition. *Virology* **218**, 389-395.

Schroeder, H. A.; Balassa, J. J.; Tipton, I. H., 1996: Essential trace metals in man: manganese, a study in homeostasis. *J. Chron. Dis.* **19**, 545-571.

Schulten, H. R.; Schnitzer, M., 1993: A State-of-Art Concept for Humic Substances. *Naturwissenschaften.* **80**, 29-30.

Schultz, H., 1965: Investigations on the viricidal effects of humic-acids in peat mull. *Tierärztl. Vochenschr.* **72**, 294-297.

Schumacher, A.; Gropp, J. M., 2000: Effect of humic acids on health state and performance of weaners. *Proc. Soc. Nutr. Physiol.* **9**, 77

Sein, L. T.; Varnum, J. M.; Jansen, S. A., 1999: Conformational modeling of a new building block of humic acid: Approach to the lowest energy conformer. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 546-552.

Senesi, N.; Bocian, D. F.; Sposito, G., 1985: Electron spin resonance investigation of copper (II) complexation by fulvic acid extracted from sewage sludge. *Soil Sci. Soc. of Am. J.* **49**, 119-126.

Shinozuka, T.; Shibata, M.; Yamaguchi, T., 2003: Molecular weight characterization of humic substances by MALDI-TOF-MS. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* **52**, 29-32.

Skogerbae, R. K.; Wilson, S. A., 1981: Reduction of ionic species by fulvic acid. *Anal. Chem.* **53**, 228-232

Smith, K. T.; Failla, M. L.; Cousins, R. J., 1979: Identification of albumin as the plasma carrier for zinc absorption by perfused rat intestine. *Biochem. J.* **184**, 627-633.

Stefanovits, P.; Filep, Gy.; Füleky, Gy., 1999: Talajtan . Budapest, Mezőgazda Kiadó.

Stevenson, F. J. 1982: Humus chemistry, genesis, composition, reactions, Wiley, New York, USA.

Swift, R. S., 1996: Organic matter characterization (chap 35). pp. 1018-1020. In D.L. Sparks et al. (eds) *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods.* Soil Sci. Soc. Am. Book Series: 5. Soil Sci. Soc. Am. Madison, WI, USA.

Szilágyi, M., 1973a: The redox properties and the determination of the normal potential of the peat-water system. *Soil. Sci.* **115**, 434-441.

Szilágyi, M., 1973b: Reduction of Fe³⁺ ion by humic acid preparation. *Soil. Sci.* **111**, 233-238.

Taylor, P.; Martinez-Torres, C.; Leets, I.; Ramirez, J.; Garcia-Casal, M. N.; Layrisse, M., 1988: Relationships among iron absorption, percent saturation of plasma transferrin and serum ferritin concentration in humans. *J. Nutr.* **118**, 1110-1115.

Thiel, K. D.; Helbig, B.; Klöcking, R.; Wurtzer, P.; Sprössig, M.; Schweizer, H., 1981: Comparison of the in vitro activities of ammonium humate and of enzymatically oxidized chlorogenic and caffeic acids against type 1 and type 2 human herpes virus. *Pharmazie* **36**, 50-53.

Thiel, K. D.; Klöcking, R.; Schweitzer, H.; Sprössig, M., 1977: In vitro studies of the antiviral activity ammonium humate against herpes simplex virus type 1 and type 2. *Zentralbl. Bakteriol.* **239**, 304-321.

Van Rensburg, C. E.; Dekker, J.; Weiss, R.; Smith, T. L.; van Rensburg E.; Schneider, J., 2002: Investigation of the antiHIV properties of oxihumate. *Chemotherapy* **48**, 138-43.

Van Rensburg, C. E. J; Malfeld, S. C. K.; Dekker, J., 2001: Topical application of oxifulvic acid suppresses the cutaneous immune response in mice. *Drug Development Res.* **53**, 29-32.

Visser, S. A., 1987: Effect of humic substances on mitochondrial respiration and oxidative phosphorylation. *Sci. Total Environ.* **62**, 347-354.

Veuthey, T.; D'Anna, M. C.; Roque, M. E., 2008: Role of the kidney in iron homeostasis: renal expression of Prohepcidin, Ferroportin, and DMT 1 in anemic mice. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* **295**, 1213-1221.

Wapnir, R. A., 1998: Copper absorption and bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **67**, 1054-1060.

Wareing, M.; Ferguson, C. J.; Green, R.; Riccardi, D.; Smith, C. P., 2000: In vivo characterisation of renal iron transport in the anaesthetized rats. *J. Physiol.* **524**, 581-586.

Weinreich, O.; Radewahn, P.; Krüsken, B., 2002: Schätzgleichungen zur Berechnung des Energiegehaltes von Mischfuttermitteln. *In: Futtermittelrechtliche Vorschriften.* Agrimedia GmbH, Spithal 4. D-29468 Bergen/Dumme, Deutschland, pp:179-180.

Whittaker, P.; Ali, S. F.; Imam, S. Z.; Dunkel, V. C., 2002: Acute toxicity of carbonyl iron and sodium iron EDTA compared with ferrous sulphate in young rats. *Regulat. Toxicol. Pharmacol.* **36**, 280-286.

Yalcin, S.; Ergun, A.; Erol, H.; Yalcin, S.; Özsoy, B., 2005: Use of L-carnitine and humate in laying quail diets. *Acta. Vet. Hung.* **53**, 361-370.

Yalcin, S.; Ergün, A.; Özsoy, B.; Yalcin, S.; Erol, H.; Onbasilar, I., 2006: The effects of dietary supplementation of L-carnitine and humic substances on performance, egg traits, and blood parameters in laying hens. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* **19**, 1478-1483.

Yang, H. L.; Chiu, H. C.; Lu, F., 1996: Effects of humic acid on the viability and coagulant properties of human umbilical vein endothelial cells. *Am. J. Hematol.* **51**, 200-206.

Yasar, S.; Gokcimen, A.; Altuntas, I.; Yonden, Z.; Petekkaya, E., 2002.: Performance and ileal histomorphology of rats treated with humic acid preparations. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* **86**, 257–264.

Ye, S. Q.; Lv, X. Z.; Zhou, A. G., 2009: In vitro evaluation of the efficacy of sodium humate as an aflatoxin B1 adsorbant. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* **3**, 1296-1300.

Yeung, C. K.; Zhu, L.; Glahn, P. R.; Miller, D. D., 2005: Tissue iron distribution and adaptation of iron absorption in rats exposed to a high dietary level of NaFeEDTA. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 8087-8091.

Zraly, Z.; Pisarikova, B.; Trckova, M.; Navratilova, M., 2008: Effect of humic acids on lead accumulation in chicken organs and muscles. *Acta Vet. Brno* **77**, 439-445.

Zdenek Z.; Pisarikova, B., 2009: Effect of Sodium Humate on the content of trace elements in organs of weaned piglets. *Acta Vet. Brno* **79**, 73-79.

12. A DOKTORI KUTATÁS EREDMÉNYEINEK KÖZLÉSE

Lektorált folyóiratokban megjelent közlemények:

Vucskits, A.V., Hullár, I., Bersényi, A., Andrásófszky, E., Tuboly, T., Szabó, J.: **A fulvosav és a huminsav hatásának vizsgálata. 1. Gazdasági mutatók, immunstimuláns hatás.** Magy. Áo. Lapja, Budapest, 2010. 132 (5), 278-284. (IF.: 0,2)

Vucskits, A.V., Hullár, I., Bersényi, A., Andrásófszky, E., Kulcsár, M., Szabó, J.: **Effect of fulvic and humic acids on performance, immune response and thyroid function in rats.** J. Anim. Physiol. a. Anim. Nutr., 94 (2010), 6. 721-728. (IF.: 1,075)

Szabó, J., **Vucskits, A. V.**, Andrásófszky, E., Berta, E., Bersényi, A., Börzsönyi, L., Pálfi, V., Hullár, I.: **Effect of dietary electrolyte balance on production, immune response and mineral concentration of the femur in broilers.** Acta Vet. Hung., (2011) 59 (3) 295-310. (IF.: 0,673)

Előadások nemzetközi konferenciákon:

Előadások nemzetközi konferenciákon:

Vucskits, A. V., Hullár, I., Szabó, J.: **The effect of fulvic and humic acid on the synthesis of T3 and T4 hormones in rats.** 10th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition (ESVCN), 2006. Október 5-7, Nantes (Franciaország), 114.

Vucskits, A. V., Hullár, I., Andrásófszky, E., Berta, E., Bersényi, A., Szabó, J.: **Effect of different cation-anion balanced feed on the immune response and digestive enzyme levels of poultry.** 11th Congress of the European Society of Veterinary Comparative Nutrition (ESVCN), 2007. November 1-3, Lipcse (Németország), 42.

Poszter prezentációk nemzetközi konferenciákon:

Vucskits, A. V., Andrásófszky E., Bersényi, A., Szabó, J.: **The effect of fulvic and humic acid on the intensity of the immune response in rats.** 10th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition (ESVCN), 2006. Október 5-7, Nantes (Franciaország), 113.

Vucskits, A. V., Hullár, I., Szabó, J.: **The effect of fulvic and humic acid on the synthesis of T3 and T4 hormones in rats.** 10th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition (ESVCN), 2006. Október 5-7, Nantes (Franciaország), 114.

Vucskits, A. V., Hullár, I., Szabó, J.: **The effect of fulvic and humic acid on the Calcium, Phosphorus and Microelement (Cu, Zn, Mn, Fe) concentrations of bone in rats.** 10th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition (ESVCN), 2006. Október 5-7, Nantes (Franciaország), 115.

Vucskits, A. V., Hullár, I., Andrásföszky, E., Berta, E., Bersényi, A., Szabó, J.: **Influence of humic substances on the immune response of rats with special regard to their possible adverse effects.** 13th International Conference on Production Diseases in Farm Animals, 2007. Július 29 – Augusztus 4, Lipcse (Németország), 242

Vucskits, A.V., Hullár, I., Andrásföszky, E., Hetényi, N., Szabó, J.: **The effect of Fulvic and Humic acid supplementation on the intensity of the immune response in rats.** 1st Central and Eastern European Laboratory Animal Conference (CEELA), Budapest, 2009. Május 23.

Szabó, J., **Vucskits, A. V.**, Andrásföszky, E., Berta, E., Bersényi, A., Börzsönyi, L., Hullár, I.: **Effect of dietary electrolyte balance on production, and mineral concentration of femur of broiler chickens.** 14th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, 2010. Szeptember 6-8, Zurich (Svájc), 105.

Előadások hazai konferenciákon:

Vucskits, A. V., Berta, E., Andrásföszky, E., Szabó, J.: **A huminsav és a fulvonsav hatása a csont kalcium, foszfor és mikroelem (Cu, Zn, Mn, Fe) tartalmára patkányokban.** Akadémiai Beszámoló, MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Budapest, 2005. 32. 19.

Vucskits, A. V., Kulcsár, M., Hullár, I., Szabó, J.: **Huminsav és fulvonsav hatása a plazma TSH, T3 és T4 koncentrációjára patkányokban.** Akadémiai Beszámoló, MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Budapest, 2005. 32. 20.

Vucskits, A. V., Andrásófszky, E., Bersényi, A., Surján, J., Szabó, J.: **Huminsav és fulvonsav hatása az immunválasz intenzitására patkányokban.** Akadémiai Beszámoló, MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Budapest, 2005. 32. 21.

Vucskits, A. V., Hullár, I., Andrásófszky, E., Berta, E., Bersényi, A., Szabó, J.: **Szervetlen (ammónium-vanadát) és szerves – vanádium-humát – kötésben lévő vanádium hatásának összehasonlítása patkány kísérletben.** Akadémiai Beszámoló, MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Budapest, 2007. 34. 10.

Vucskits, A. V., Hullár, I., Andrásófszky, E., Hetényi, N., Szabó, J.: **A huminsav és a fulvosav hatása az immunválasz intenzitására patkányokban.** Akadémiai Beszámoló, MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Budapest, 2008. 35. 5.

Vucskits, A. V., Hullár, I., Andrásófszky, E., Szabó, J.: **A huminsav és a fulvosav hatása az immunválasz intenzitására patkányokban.** Akadémiai Beszámoló, MTA Állatorvos-tudományi Bizottsága, Budapest, 2010. 37. 8.

13. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként szeretném megköszönni témavezetőim, Dr Szabó József és Dr. Hullár István segítségét. Mindkettejük szakmai hozzáértése és tapasztalata elengedhetetlen segítségnek bizonyult a disszertáció elkészítésében. Külön köszönöm nekik a türelmüket és, hogy a lelkiismeretem hangjai voltak a kellő pillanatokban.

Köszönettel tartozom az Állattenyésztési, takarmányozástani és Laborállat-tudományi intézet dolgozóinak, név szerint: Andrásovszky Emesének, Berta Erzsébetnek, Krizsán Juditnak, Koncz Klárinak, Gerics Rózsának, Pöntör Ildikónak, dr. Hetényi Nikolettának, Aipel Lászlóné Natasának, dr. Bersényi Andrásnak, Szolnoki Zsoltnak és Hirt Károlynak a munkám elvégzéséhez nyújtott segítségükért.

Az immunológia paraméterek feldolgozásában nyújtott segítségéért köszönettel tartozom Dr. Tekes Lajosnak. A szövettani vizsgálatok elvégzéséért Dr. Glávits Róbertet illeti köszönet. Dr. Kulcsár Margitnak a pajzsmirigy hormonok meghatározásában nyújtott segítségét köszönöm. A FRAP- és AST-vizsgálatok végzésében nyújtott segítségéért Ribiczeyné Szabó Piroskának tartozom köszönettel. Dr. Szigeti Gábor segítése a bakteriológia vizsgálatok elvégzésében volt nélkülözhetetlen.

Köszönöm Dr. Csicsor Jánosnak, hogy rendelkezésünkre bocsájtotta a kísérletek elvégzéséhez szükséges vizsgálati anyagokat (FA_D és HA_D).

Szeretnék köszönetet mondani családomnak a dolgozat elkészítése során tanúsított türelmükért és támogatásukért, nélkülük mindez nem jöhetett volna létre.