

Állatorvostudományi Egyetem
Élettani és Biokémiai Tanszék
Biokémiai Osztály



Butirát alapú takarmánykiegészítők hatása egyes tight junction
és transporter fehérjékre csirkék emésztőrendszerében

Effects of butyrate-based feed additives on specific tight
junction and transporter proteins in the digestive tract of chickens

Bechtold Sebestyén

Témavezető: Dr. Mackei Máté PhD

2023

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke	3
2. Bevezetés/Irodalmi áttekintés	4
2.1. A zsírsavak általános jellemzése	4
2.2. A rövid szénláncú zsírsavak, különös tekintettel a butirátra.....	4
3. Célkitűzés.....	10
4. Anyag és módszer	11
4.1. Állatok és kezelések.....	11
4.2. Mintavételek	12
4.3. A claudin-1, claudin-3 és MCT-1 fehérje koncentrációjának meghatározása	12
4.4. Az SCFA-koncentráció mérése az ingesta mintákban.....	13
4.5. Statisztikai elemzések.....	14
5. Eredmények.....	15
5.1. Claudin-1 fehérje koncentráció	15
5.2. Claudin-3 fehérje koncentráció	17
5.3. MCT-1 fehérje expresszió	19
5.4. Béltartalom beli butirát koncentráció	21
6. Megbeszélés	23
7. Összefoglalás	28
8. Summary.....	29
9. Irodalomjegyzék	31
10. Köszönetnyilvánítás.....	38

1. Rövidítések jegyzéke

ALA = Alfalinolénsav

BCA = Bicinchoninic Acid

CSB = Kémiaailag védett Na-butirát

DHA = Docosahexaenoic acid (Dokozahexaénsav)

DPA = Docosapentaenoic acid (Dokozapentaénsav)

ELISA = Enzyme-linked Immunosorbent Assay

EPA = Eicosapentaenoic acid (Eikozapentaénsav)

FA = Fatty Acid (Zsírsv)

FCR= Feed conversion ratio (Takarmányértékesítés)

FO = Fish Oil (Halolaj)

GIT = Gastrointestinal Tract – Emésztő traktus

GLUT = Glucose Transporter (Glükóz transzporter)

HRP = Horseradish Peroxidase (Torma-peroxidáz)

IEC = Intestinal Enterocytes

IL-6 = Interleukin-6

IPEC J2 = Intestinal Porcine Enterocytes – Jejunum

IR β = Inzulin receptor β

LA = Linolsav

LPS = Lipopoliszacharid

MCT-1 = Monokarboxilát- Transzporter

M-PER = Mammalian Protein Extraction Reagent

NSP = Non-Starch Polysaccharide (Nem keményítő poliszacharid)

PPAR = Peroxisome Proliferator Activated Receptor

PUFA = Poliunsaturated Fatty Acid (Többszörösen telítetlen zsírsv)

SCFA = Short Chain Fatty Acid (Rövid szénláncú zsírsv)

SEM = Standard Error of Mean (Átlag standard hibája)

SPF = Specific Pathogen Free

TNF α = Tumor Nekrózis Faktor α

XOS = Xilo-oligoszacharidok

2.Bevezetés/Irodalmi áttekintés

2.1. A zsírsavak általános jellemzése

A zsírok, vagy más néven triacil-glicerinek vagy trigliceridek a glicerinnel hosszú szénláncú zsírsavakkal alkotott vegyületei (Fujimoto et al. 2011).

A zsírsavakat általában két fontosabb szempont alapján szokták kategorizálni. A szénlánc hosszúsága alapján lehetnek rövid (Short Chain Fatty Acids, SCFA), közepes (Medium Chain Fatty Acids) és hosszú (Long Chain Fatty Acids) szénláncú zsírsavak. Rövid szénláncú például az ecetsav (C2:0), propionsav (C3:0), vajsav (C4:0); közepes szénláncú például a kaprinsav (C10:0); hosszú szénláncú például a palmitinsav (C16:0), sztearinsav (C18:0), olajsav (C18:1). A másik lényeges szempont a zsírsavak jellemzését tekintvepedig a szénláncok telítettsége, mely alapján lehet telített, ha nem tartalmaz kettős kötést, és lehet telítetlen, ha legalább egy kettős kötést tartalmaz. Telítettre példa a palmitinsav (C16:0) és sztearinsav (C18:0); telítetlenre pedig az olajsav (C18:1), linolsav (C18:2), linolénsav (C18:3). Egy zsírsav egyszerre több kettős kötést is tartalmazhat, ezeket nevezzük többszörösen telítetlen zsírsavaknak (PUFA= Poliunsaturated fatty acid). A kettős kötés helye alapján megkülönböztetünk omega-3, -6, -9 zsírsavakat. Az omega megjelölés annyit jelent, hogy a zsírsav láncvégi metilcsoportjától hányadik kötésnyire található az első telítetlen/kettős kötés. Cisz zsírsavaknak ezen belül azokat a zsírsavakat nevezzük, melyeken a szénhez kapcsolódó hidrogén atomok egymással megegyező oldalon helyezkednek el, transz zsírsavaknak azokat, melyeknél egymással szemben helyezkednek el. Általánosságban elmondható, hogy cisz konformációban lévő kettőskötést tartalmazó zsírsavak fontosak a szervezet számára, míg a transz formában lévők károsak. Továbbá fontos tulajdonságuk ezeknek a telítetlen szerves savaknak, hogy hol találhatóak bennük a kettős kötések, ezt a vegyület karboxil csoport felőli oldaláról számolják és deltával jelölik. (Ackman, 1989)

2.2. A rövid szénláncú zsírsavak, különös tekintettel a butirátra

A rövid szénláncú szerves savakat ezen belül is leginkább a négy szénatomból álló szerves savat, a butirátot (vajsav) és annak sóit manapság előszeretettel használják a hústermelő ágazatban, a hozamfokozásra használt antibiotikumok és hormonok alternatívájaként. (Kulcsár et al., 2017) Az utóbb említett anyagokat, addig rendszeresen használták, mint takarmánykiegészítő, teljesítménynövelő, növekedés fokozó anyagok, később ilyen jellegű alkalmazásukat többek között az antimikrobiális rezisztencia kialakulásának kockázata miatt 2006-ban betiltották az Európai Unióban. (Kulcsár et al., 2017) Az Egyesült Államokban azonban a mai napig is szélesebb körben alkalmazzák e célra ezeket az anyagokat (Gonzalez et

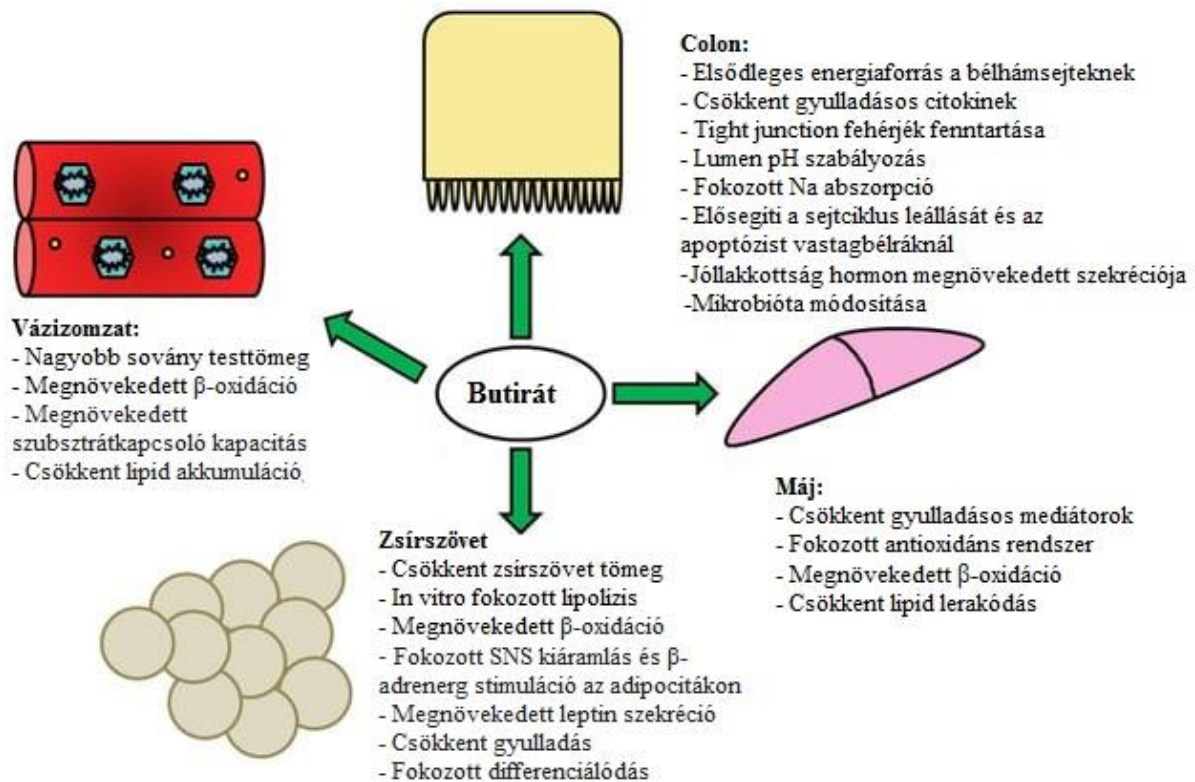
al., 2017) Mivel azonban az állatok megfelelő fejlődési erélyét csak a kiegyensúlyozott és az anyagcsere folyamataikat kielégítő takarmányozással lehet elérni az intenzív hústermelésben, előtérbe kerültek és manapság szívesen alkalmazzák az állatok takarmányozásában a rövid szénláncú szerves savakat (Dai et al., 2021). A baromfítakarmányozásban ezek közül is mindinkább a vajsavat részesítik előnyben (Chamba et al., 2014)

Butiráthoz az állatok kétféle módon juthatnak, egyrészt a butirátot és annak sóit (általában Na-(n)-butirátot) szabadon a takarmányhoz keverhetik kiegészítésként. Ebben az esetben a butirát a proximális bélszakaszból (zúzógyomor-duodenum), gyorsan felszívódik. Előnyösebb szeretik ezért a vajsav védett formáit alkalmazni észterezett vagy kapszulázott formában, melyek ezzel szemben sokkal elnyújtottabb felszívódást eredményeznek (Chamba et al., 2014). Ezen kívül létezik kémiai védett nátrium-butirát (CSB) is, mely a nátrium-butirát egy speciális formája, amelyet a puffer-sók fizikai és kémiai módosítási technológiája véd, hogy elegendő butirátot biztosítson a vékonybélben (Wan et al., 2022). Az eddig említett módszerekkel magát a vajsavat adjuk a takarmányhoz (exogén eredet), azonban létezik a kiegészítésnek egy másik formája is, mely az endogén módon keletkező butirát mennyiségének megemelkedését segíti elő, az állatok anaerob mikrobiális fermentációját kihasználva. A bakteriális emésztési folyamat során rövid szénláncú zsírsavak keletkeznek, ezeken belül is leginkább ecetsav, propionsav, vajsav (több, mint 95%-ban). Baromfiban és monogastrius állatokban ez a folyamat főképp a vastag- és vakbélben történik, míg kérődzőkben az előgyomrokban, az itt lévő mikrobiótának köszönhetően. A fermentációhoz szükséges tápanyagok koncentrációjának növelésével elérhetjük a mikrobióta magasabb SCFA termelését, ennek köszönhetően a butirát szintjének növekedését is. Ezeket az anyagokat oldható nemkeményítő típusú szénhidrátoknak nevezzük (non-starch polysaccharides, NSP) és főleg béta-glükánokból és arabinoxilánokból állnak. (Józsefiak et al., 2005). Ezen felül sok kutatásban vizsgálták különböző enzimek (xilanázok, β -glükánázok) emésztésben betöltött szerepét is. Ezeknek a kísérleteknek az NSP-kben gazdag takarmányok béltartalom viszkozitásra gyakorolt hatása adott indokot, mely növeli a passzázs időt a bélrendszerben, ami a baktériumok szaporodására jótékony hatással bír, azonban az emésztőenzimek nem férnek hozzá a szubsztrátjaikhoz, mellyel a takarmányhasznosulás romlik (Cowan et al., 1996). Az enzimek hatására a hosszú szénláncú NSP-k kisebb oligoszacharidokra esnek szét, melyeket az emésztőrendszer baktériumai így már könnyebben tudnak szubsztrátként hasznosítani. (Kulcsár et al. 2016). A rozs és búza alapú takarmányok nagy mennyiségben tartalmaznak ilyen nem keményítő típusú poliszacharidokat, azonban vizsgálták más gabona típusok hatását is a

vakbélben lévő rövid szénláncú zsírsavak keletkezésére, melynek eredményeként kiderült, hogy árpa alapú takarmányok növelték a butirát : propionát arányát, míg a zab alapú takarmányoknál épp az ellenkezője volt elmondható. (Józefiak et al. 2007). Egy újabb alternatív megoldás lehet a mikrobiális keresztáplálás (cross-feeding), melynek lényege, hogy egyéb bélrendszeri baktériumokkal termeltetjük meg a butirát termelő baktériumok szükséges szubsztrátjait. A xilo-oligoszacharidok (XOS) ilyen vegyületek, melyek laktáttá alakíthatók, amely tovább metabolizálódik butiráttá. A keresztáplálási reakciók támogatására probiotikus tejsavtermelőket lehet hasznosítani. A butirátot termelő Clostridium IV. és XIVa. klaszter törzsek közvetlen etetése a jövő eszköze, feltéve, hogy a szigorúan anaerob baktériumok nagyüzemi termelése optimalizálható (Onrust et al. 2015).

Számos kutatás foglalkozik butirát jótékony intesztinális és extraintesztinális hatásaival. Brojler csirkéken végzett kutatások kimutatták, hogy a madarak gyarapodásának első 21 napjában pozitív hatással van a növekedési teljesítményre (Hu és Guo, 2007, Panda et al., 2009), azonban a jejunumban gátolja a *Lactobacillusok* növekedését (Hu és Guo, 2007). Ezen felül a takarmány hasznosítás is javul a vizsgált állatokban, valamint a butirát pH- csökkenést is okoz a proximális emésztő traktusban. A vékony- és vakbélben jelenlévő *E. Coli* számának redukálását is leírták a vajsav hatására, mely szintén jótékony hatással lehet a bélflóra stabilizálása és a patogén baktériumok mennyiségének visszaszorítása szempontjából (Panda et al., 2009). Hatással van továbbá a butirát a pro-inflammatorikus citokinek (IL6 – Interleukin 6, TNF α – Tumor Nekrózis Faktor α) termelésére, szérum antioxidáns enzim aktivitásra és a lipid peroxidációra is (Zhang et al., 2011). Továbbá, mint epigenetikai szempontból is aktív molekula, a butirát szabályozza a transzkripciót a hiszton-acetiláció befolyásolásán keresztül, amely a DNS-metilációval együtt a sejtműködés egyik legfontosabb epigenetikai szabályozási útvonala. (Mátis et al., 2013). Magas zsírtartalmú takarmánnyal etetett patkányokon végzett kísérletek azt is kimutatták, hogy a zsírsav segítette a máj steatosisának és gyulladásának csökkentésében, valamint mellett a máj TNF α expresszióját csökkentésében is részt vett. Segített továbbá a GLUT és PPAR receptorok expressziójának helyreállításában, a májban és zsírszövetben. (Raso et al., 2013). Szintén patkányokon végzett kísérletekben vizsgálták a butirát pulmonális hypertensiora gyakorolt hatását. Csökkentette a jobb kamrai systolés nyomást és jobb kamrai hypertrophiát, mérsékelte a vascularis remodelling következtében kialakuló distalis artériák megvastagodását a tüdőben, mérsékelte a gyulladással citokinek (CD68, CD163) hypoxia által kiváltott felhalmozódását, megakadályozta a hypoxia által kiváltott tüdőödémát és érszivárgást, a tüdő mikrovaszkuláris endothel sejtekben növelte a tight

junction fehérjék expresszióját (occludin, claudin-1, cingulin), illetve növelte a fehérje-acetilációt (Karoo et al., 2021). Mindezen túl képes részt venni az inzulin receptor β (IR β) expressziójának szelektív szabályozásában vázizomban és májban, illetve mTOR fehérje expresszióját is megfigyelték májban és subcutan zsírszövetben (Mátis et al., 2015). Inzulin rezisztencia kezelésében és megelőzésében is hatásosnak bizonyult egér kísérletekben (Gao et al., 2009)



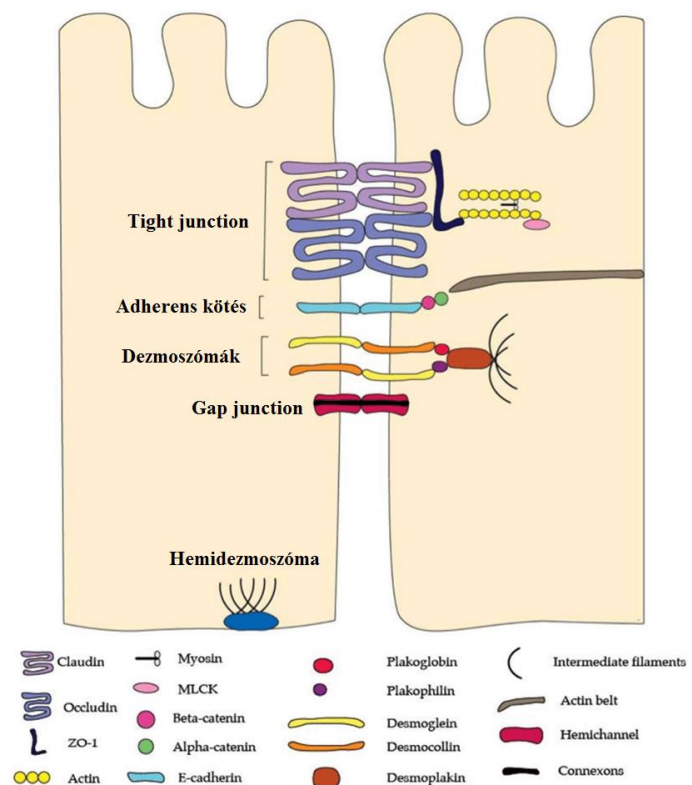
1. ábra Összefoglaló ábra a butirát hatásairól (McNabney et al. 2017)

Ami a butirát bélrendszeri hatásait illeti, az régóta köztudott, hogy a többi rövidszénláncú zsírsavval együtt elsődleges energiaforrás a bélben lévő mikrobióta illetve a colonocyták számára. Ezen hatásai következtében alkalmazható a bélsejtek megerősítésére és a bélbarrier támogatására Eimeria fajok okozta coccidiosis, valamint *Clostridium perfringens* okozta nekrotikus enteritis esetén (Paap et al., 2016). Baktericid hatása is ismert ugyanakkor, amelyet indirekt módon a begy, zúzógyomor és vékonybél pH-jának csökkentésén keresztül ér el, ezzel az ott élő káros baktériumok (*E. Coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*) száma csökken. (Van Deun et al., 2008; Chamba et al., 2014). Az emésztő-traktus hosszára vonatkozó kutatások kimutatták, hogy mind a jejunum, mind a vastagbél megnő a butiráttal kiegészített takarmánnyal etetett csoportoknál. Ugyanezen kutatásban azt találták, hogy a jejunumban lévő kripták száma, valamint az ileumban lévő villusok magassága is szignifikánsan nőtt. (Hanim et

al., 2023). Más kutatások a duodenum vizsgálata során jutottak hasonló eredményre: a villusok hossza és a kripták mélysége növekedett. (Panda et al., 2009). In vitro patkány-kísérletekben arra is találtak bizonyítékot, hogy a butirát képes a vastagbél aktív Na és Cl abszorpcióját stimulálni (Minder és Mehta 1989).

A fehérje emészthetőségre vonatkozóan is folytattak vizsgálatokat, melyeket gazdasági szempontok mellett környezetvédelmi elvárások is motiváltak. Ennek magyarázata hatékonyabb nitrogén hasznosításban, így a következetes alacsonyabb nitrogén felhasználásban keresendő. Butirát kiegészítéssel képesek voltak javítani a rosszul emészthető fehérjeforrással takarmányozott brojlerek teljesítményét (Qaisrani et al., 2015). Ezeknek a céloknak az elérésében alternatívát jelenthet még a takarmány limitáló aminosavakkal való kiegészítése is (Aletor et al., 2000). Hasonló eredménnyel zárultak az egyetem Biokémiai Osztályának korábbi kísérletei is. A Ross 308 brojlereken végzett kísérletek a hasított test hozam növekedésére, valamint a húsösszetételre (pectoralis, femoralis izom) vonatkoztak. Mindkét esetben egyaránt megfigyelhető volt védett és nem védett formában adagolt butirát jótékony hatása. (Mátis et al., 2019).

A bél integritása alapvetően három pilléren nyugszik: „a hámsejtekből, tight junction fehérjékből és bélszekrétrumokból álló bélhámgát megakadályozza a luminális anyagok és antigének átjutását a paracelluláris téren keresztül.” In vitro kísérletek már születtek a témában a bél integritására, azon belül is a tight junction fehérjék permeabilitására vonatkozóan LPS által gyulladásban tartott IPEC J2 sejt kultúráján. Egyes tight junction fehérjék (claudin-3, -4) mRNS expressziójának növelésén, valamint a bélnyálkahártya hámsejtek energia homeosztázisának optimalizálásán keresztül volt képes növelni a bélintegritást a butirát (Yan és Ajuwon, 2017).



2. ábra A bélbarrier kötéselei (Lee et al., 2018)

Mások cdx2- IEC monolayer sejt kultúrán végzett in vitro vizsgálatokra alapozva fedezték fel a claudin 1 tight junction fehérje transzkripciójának növelésére kifejtett hatását (Wang et al., 2012). Sertés in vivo kísérletek azonban ellentmondásos eredményeket mutattak. Míg az occludin növekedett vékonybélbeli (duodenumban inkább, mint a jejunumban) expresszióját mérték, addig a claudin-1 expressziójának egyértelmű csökkenését figyelték meg vékonybélben, míg annak expressziója vastagbélben nem egyértelműen, de inkább csökkent (Grilli et al., 2016). Inulinnal kiegészített takarmánnyal etetett fehér leghorn SPF állományban claudin-1 up-regulációját figyelték meg az ileumban, amely hatása nagy valószínűséggel közvetett mikrobiális eredetű butirát telelés intenzitásának fokozódásához köthető (Song et al., 2018)

A butirát azonban csak abban az esetben képes kifejteni extraintestinalis hatásait, amennyiben biztosított a megfelelő felszívódása, melynek egyik kulcsa a monokarboxilát-transzporter 1 (MCT-1), mint a fő SCFA-transzporter. A monokarboxilát-transzportereknek négy izoformája létezik különböző élőlényekben, a funkciójuk azonban azonos: katalizálják a monokarboxilátok, mint a piruvát, butirát, L-laktát transzportját a plazmamembránon keresztül (Halestrap és Andrew, 2012).

3. Célkitűzés

Az antibiotikumok és hormon készítmények hozamfokozásra szánt alkalmazásának betiltása óta egyre nagyobb igény mutatkozott az élelmiszeripar hústermelő ágazataiban a minél gazdaságosabb hústermelés elérése érdekében. Ennek érdekében folyamatos kutatások zajlanak az új, hatékonyabb és jól alkalmazható takarmány-kiegészítők iránt. A butirát készítmények ebből a szempontból biztató eredményeket mutatnak megannyi intesztinális és extraintesztinális hatásaiknak köszönhetően, mint például a bél-barrier funkciójának támogatása. Ebben a témában azonban eddig nem zajlottak kísérletek a baromfiágazatban, de in vitro és egyéb állatfajokkal zajlott kutatások alátámasztották a butirát bélintegritásra gyakorolt pozitív hatását.

Jelen vizsgálat fő célja a claudin-1 és -3 fehérje szintjének változásainak nyomon követése volt a proventriculus, a jejunum/ileum és a caecum nyálkahártyájában csirkékben, amelyeket különböző védett Palital® butirát tartalmú takarmányokkal etettünk (S90, CC80, Quattro, SC40). Továbbá a monokarboxilát-transzporter 1 (MCT-1) mint a fő SCFA-transzporter kifejeződését is meg akartuk vizsgálni mindezen bélszakaszokban, mivel az MCT-1 mennyisége nagymértékben befolyásolhatja a butirát felszívódását és következésképpen a butirát extraintesztinális hatásait. Ezek a vizsgálatok együttesen megfelelő betekintést nyújthatnak a szájon át adott védett butirátnak a bél egészségére gyakorolt hatásaiba, kiemelve a butirát feltételezett szerepét a bélbarrier integritásának javításában.

4. Anyag és módszer

4.1. Állatok és kezelések

Az állattakarmányozási kísérletet az Állatorvostudományi Egyetem Élettani és Biokémiai Tanszékének Biokémiai osztályán végeztük. Egy kereskedelmi keltetőből (Gallus Company, Devecser, Magyarország) származó, kikelési napon született hím Ross 308-as brojlercsirkéket (összesen n=100) véletlenszerűen osztottunk öt takarmányozási csoportba (n=20 csoportonként; a kísérleti csoportok részleteit később ismertetjük). A környezeti és klimatikus feltételeket a Ross technológia követelményeinek megfelelően állítottuk be (Aviagen, 2014); takarmányt és ivóvizet *ad libitum* biztosítottunk a vizsgálat teljes időtartama alatt. Az izonitrogén és izokalóriás takarmányt a hollandiai Research Diet Services (Ross-308) ajánlásai szerint állították össze.

A csirkék elhelyezése és kezelése szigorúan a nemzeti és nemzetközi jogszabályoknak, valamint az intézményi iránymutatásoknak megfelelően történt. A kísérleti eljárásokat a Pest Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági, Növényvédelmi és Talajvédelmi Igazgatóság, Budapest, Magyarország (engedély száma: PEI/001/1430-4/2015) engedélyezte.

A kísérleti állatokból a következő takarmányozási csoportokat alakítottuk ki:

- Kontrollcsoport butirát kiegészítés nélkül.
- Négy csoport, amelyek a Palital® különböző védett butirát termékeivel kiegészített takarmányt kaptak (S90, CC80 Quattro, SC40), amelyek adagolása annak megfelelően történt, hogy a takarmány minden esetben 500 ppm (0,5 g/kg takarmány) vajsavat tartalmazzon. A tápok összetételét- és butiráttartalmát a hollandiai Nutricontrol megerősítette.
 - **S90:** Intest-Plus S90, filmbevonatú Na-butirát, rendkívül magas, 90% Na-butirát tartalommal. Gyengébb védelmet, gyorsabb butirát felszabadulást biztosít.
 - A további termékek mind növényi zsírból álló mátrixba ágyazott, ezáltal lipidburokkal védett kiegészítők, elnyújtottabb butirát-felszabadulással, eltérő típusú és mennyiségű butirát-tartalommal, az alábbiak szerint:
 - **SC40:** Intest-Plus SC40, 40% Na-butirát-tartalom
 - **Quattro:** Intest-Plus Quattro, 70% butirát-tartalom, vegyesen Na- és Ca-butirát
 - **CC80:** Intest-Plus CC80, 80% Ca-butirát-tartalom

4.2. Mintavételek

Az állatok testsúlyát minden egyes táplálkozási fázis végén megmértük; a takarmányfelvételt minden karámban naponta ellenőriztük. Meg kell azonban jegyezni, hogy az alkalmazott kísérleti elrendezést a butirátnak a bélintegritás és a termékek butirátfelszabadulási mintázatára gyakorolt hatásának vizsgálatára tervezték, és nem elegendő részletes takarmányozási és termelékenységi (növekedési teljesítmény) adatok értékelésére.

A csirkéket előzetes éheztetés nélkül, szén-dioxid-narkózisban vágtuk le, a mintavételeket a 21. napon végeztük. A mintavételezett állatok száma 10 egyed/csoport/időpont volt.

A gyomor-bél traktus (GIT) következő szakaszaiból vettünk bélsármintákat:

- Proventriculus + Zúzógyomor
- Jejunum + Ileum
- Caecum

Mivel a proventriculus és a zúzógyomor funkcionálisan egy egységnek tekintendő, ingestájukat összekevertük és együtt vettük a mintát, de a minta nagyrészt a zúzógyomorból származott, ezért ezeket a mintákat "zúzógyomor" néven említjük. A jejunum és az ileum tekintetében a Meckel-divertikulumtól 10 cm-re proximálisan kezdődő és 10 cm-re distalisan végződő bélszakaszból vettünk ingesta mintát. A vakbél tartalmát a bal és a jobb zsákból származó ingesta keverékeként vettük.

A béltartalommal kapcsolatos mintavétel után a megfelelő bélszakaszokat hosszanti irányban felnyitottuk, hűtött fiziológiás sóoldattal átöblítettük, és a nyálkahártyát mikroszkópos tárgylemezzel óvatosan lekapartuk minden egyes szakaszból.

Az összes béltartalom- és nyálkahártya-mintát azonnal szárazjégen lefagyasztottuk, majd a további feldolgozásig -80°C hőmérsékleten tároltuk.

4.3. A claudin-1, claudin-3 és MCT-1 fehérje koncentrációjának meghatározása

A jégen történő felolvasztás után a nyálkahártya-mintákat 1% Halt proteáz inhibitor koktéllal frissen kiegészített M-PER (Mammalian protein extraction reagent) lízispufferben (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) homogenizáltuk (kb. 1 ml-t 100 mg szövethez) egy Potter-Elvehem homogenizátorral. A homogenizátumokat 10 percig $5000\times g$ -vel centrifugáltuk, és a felülúszót használtuk fel a további analízishez.

A homogenizátumok összfehérje-koncentrációját Pierce Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) segítségével vizsgáltuk, standardként szarvasmarha-szérumalbumin (BSA) alkalmazásával, és 25 µl mintát adtunk 200 µl reagenskeverékhez (az A és B reagens 50:1 arányú keveréke). Az abszorbanciát 30 perc 37 °C-on történő inkubálás után 562 nm-en mértük Multiskan GO 3.2 olvasóval.

A claudin-1, claudin-3 és MCT-1 fehérjebőséget a MyBioSource (MBS026451, MBS085865, MBS9392435, San Diego, USA) cégtől származó csirkespecifikus kvantitatív szendvics ELISA-tesztekkel mértük a gyártó által leírtak szerint. Röviden, az összes alkalmazott ELISA-készlet esetében 50 µl mintát és 100 µl HRP-konjugált reagenst pipettáztunk minden lyukba, és 60 percig inkubáltuk 37°C-on. Négyszeri mosás után 50 µl A kromogén oldatot, valamint 50 µl B kromogén oldatot adtunk a mélyedésekhez. A lemezeket óvatosan körkörösén mozgattuk és 15 percig 37°C-on tartottuk. Ezt az inkubációs lépést követően a reakciót 50 µl Stop Solution hozzáadásával blokkoltuk, majd 15 percen belül az abszorbanciaértékeket 450 nm-en mértük a Multiskan GO 3.2 olvasóval. A fehérjeexpressziós értékeket az összfehérje-koncentrációra standardizáltuk a megbízható összehasonlítás érdekében.

4.4. Az SCFA-koncentráció mérése az ingesta mintákban

Az ingesta minták SCFA-koncentrációját gázkromatográfia – tömeg spektrometria (gaschromatography – mass spectrometry; GC-MS) módszer segítségével elemeztük. Az ingesta-mintákat úgy készítettük elő a vizsgálathoz, hogy 800 mg béltartalmat 8 ml desztillált vízzel és 135 µl NaOH-oldattal (0,2 M) kevertünk össze, hozzáadtunk 700 µl izovaleriánsav-oldatot (200 mg/100 ml) mint belső standardot és 10 ml kloroformot az extrakcióhoz. Intenzív keverés (10 perc) után a víz-metanol alapú és a kloroform alapú fázisokat 5 perces centrifugálással elválasztottuk egymástól. Ezt követően 2100 µl víz-metanolos fázist 250 µl metafoszforsavval (28,5 m/m%) kevertünk.

Az elemzésekhez egy GCMS-QP2010 SE Shimadzu gázkromatográfot használtunk. Az oszlopok Zebron ZB-WAXplus típusúak voltak (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm), az oszlop hőmérsékleti programját a következők szerint állítottuk be: 75°C-175°C, 11°C/perc sebességgel, 175°C 1 perc. Az injektálási mód splitless volt, a mintavételi idő pedig 0,7 perc. Az áramlásszabályozási mód lineáris sebesség (49,4 cm/sec), a nyomás 119,9 kPa, a teljes áramlás: 77,1 ml/perc, oszlopáramlás: 1,81 ml/perc, tisztító áramlás: 3 ml/perc, az ionforrás hőmérséklete: 200 °C, a határfelület hőmérséklete: 200 °C.

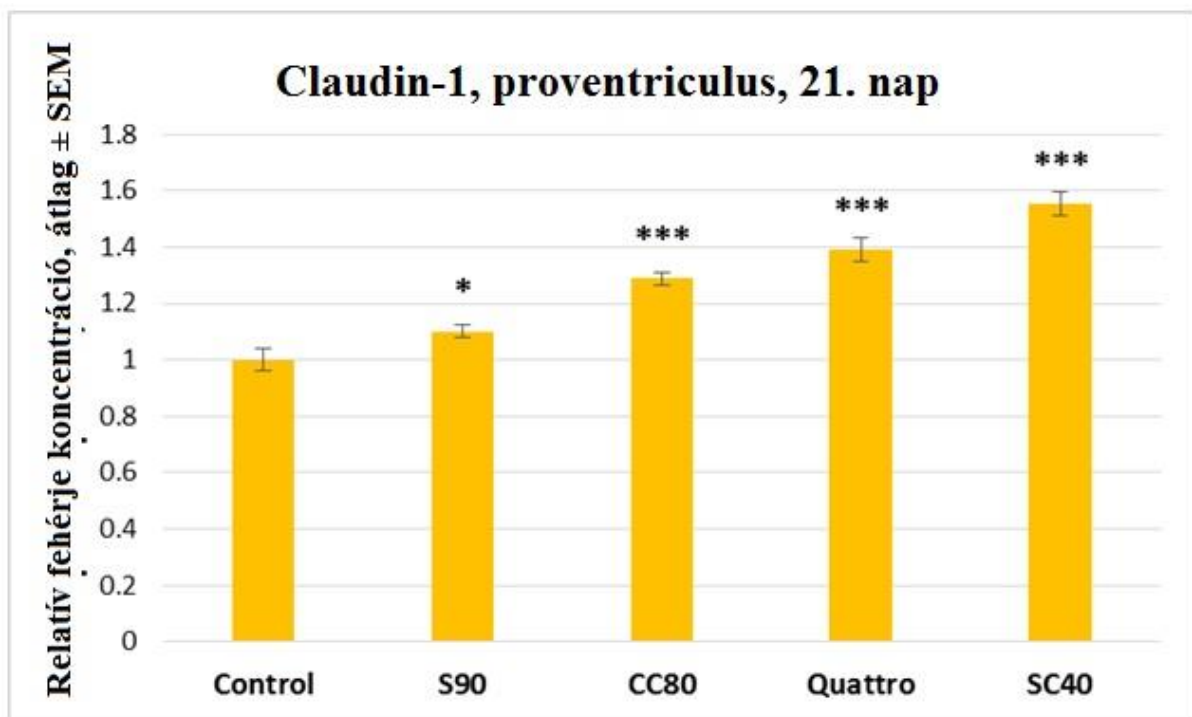
4.5. Statisztikai elemzések

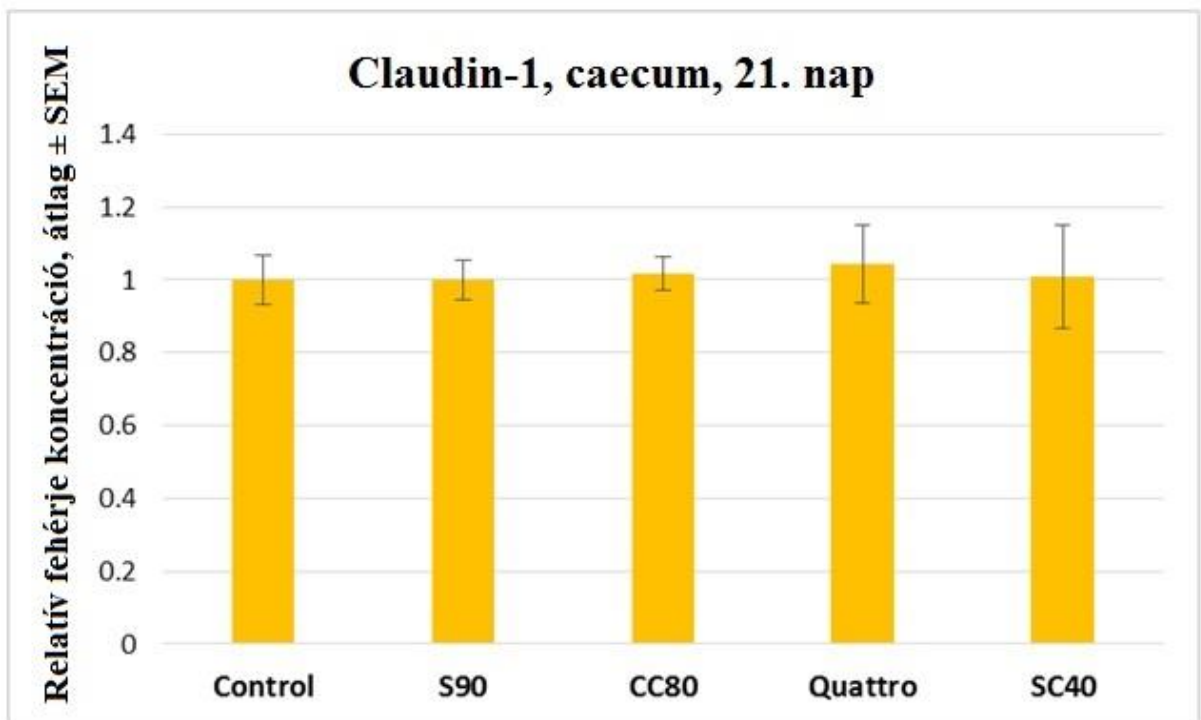
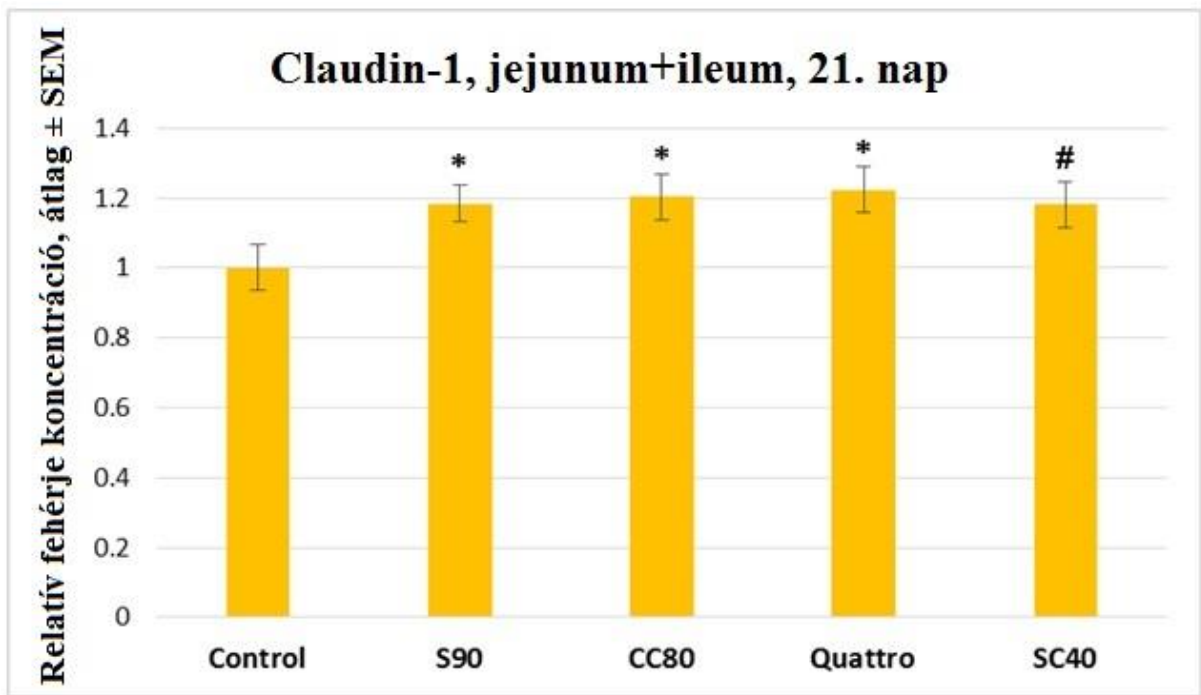
Az adatokat az R 3.2.2 szoftverrel elemeztük statisztikailag, multi-way ANOVA és Tukey post-hoc tesztek alkalmazásával a páronkénti összehasonlításokhoz. A csoportok közötti különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha $P < 0,05$. Az Eredmények részben a post-hoc tesztekkel nyert P-értékeket mutatjuk be és átlag \pm SEM-ben (standard hiba) fejezzük ki.

5. Eredmények

5.1. Claudin-1 fehérje koncentráció

A 21. napon a claudin-1 fehérje koncentrációja a proventriculusban minden kezelés esetén szignifikánsan növekedett ($P=0,036$ az S90 táp esetén, $P<0,001$ a CC80, Quattro és SC40 takarmány csoportokban). A jejunum+ ileum bélszakaszokban mérhető claudin-1 koncentráció a proventriculushoz hasonlóan szignifikánsan emelkedett a megfigyelt csoportokban ($P=0,041$, $P=0,042$, $P=0,024$ és $P=0,061$). A caecumban nem találtunk szignifikáns különbséget a butiráttal kezelt és a kontrollcsoportok között.

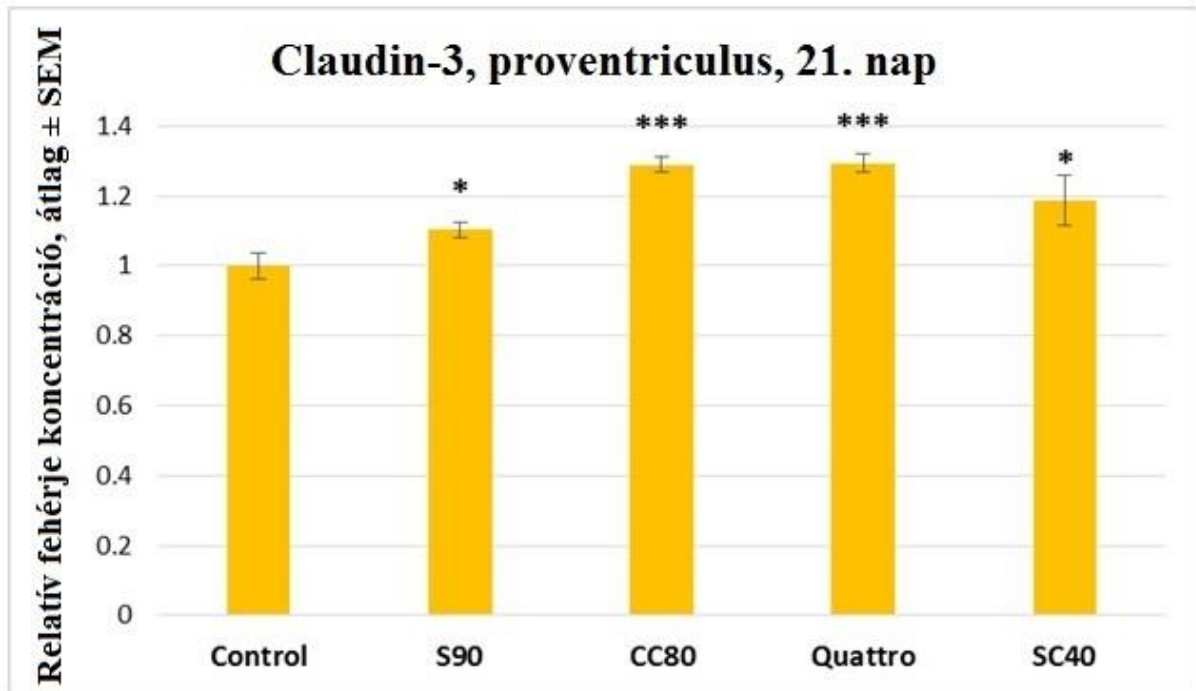


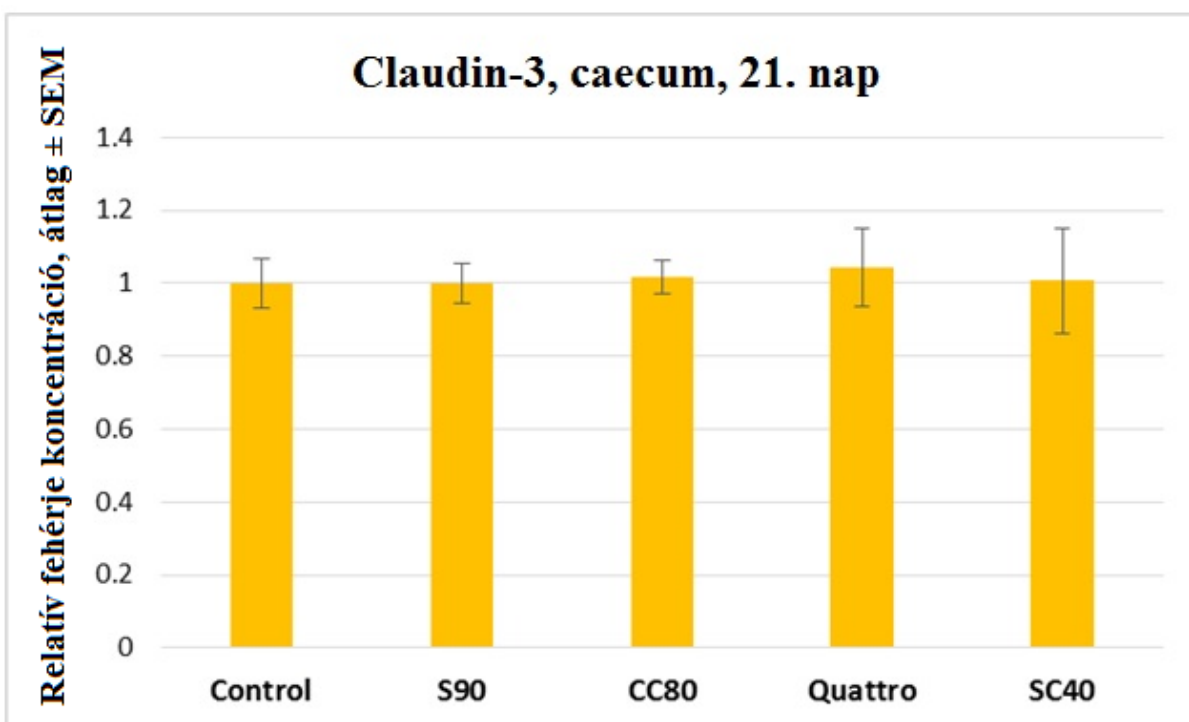
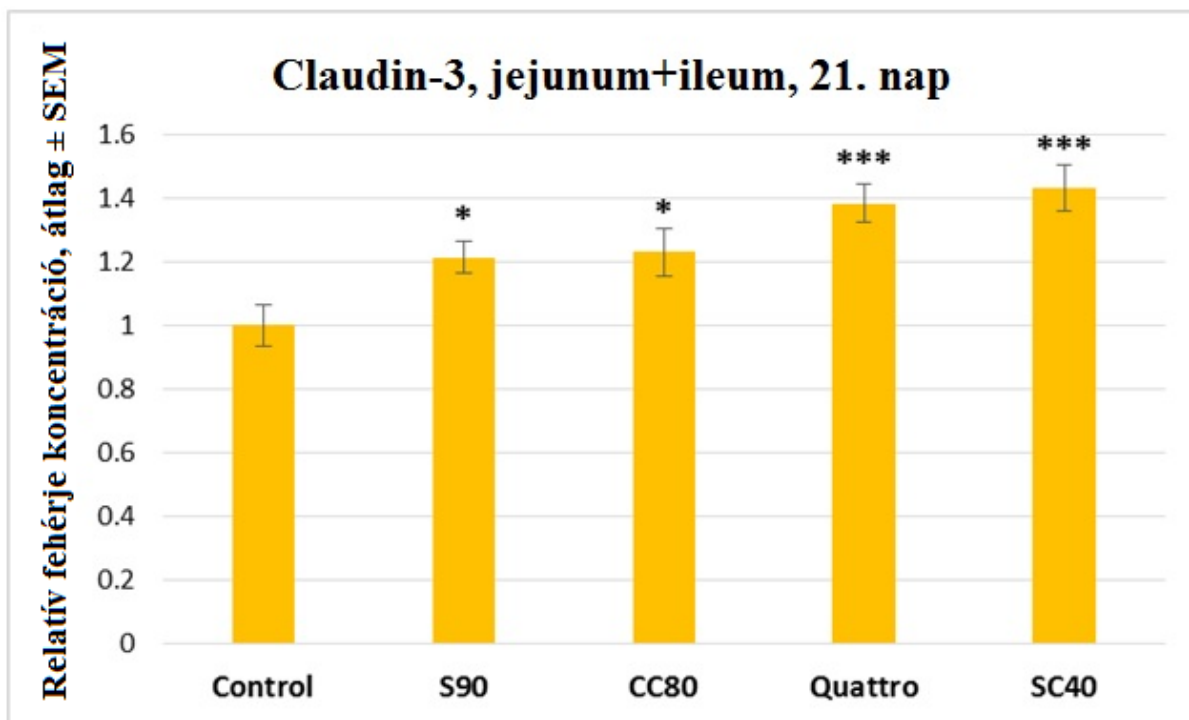


3. ábra VA claudin-1 relatív fehérjeexpressziója a gyomor-bélrendszer különböző szakaszainak nyálkahártyájában a 21. napon (a kontrollok expresszióját 1-nek tekintve). # $P < 0,10$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ és *** $P < 0,001$ a kontrollokhoz képest.

5.2. Claudin-3 fehérje koncentráció

A 21. napon a proventriculusban lévő claudin-3 fehérje koncentrációja minden kezelés hatására szignifikánsan emelkedett (P=0,036 az S90 esetében, P<0,001 a CC80 és a Quattro esetében, P=0,034 az SC40 esetében). A jejunum+ileumban minden kezelés szignifikánsan növelte a claudin-3 koncentrációját (P=0,020 az S90 esetében, P=0,037 a CC80 esetében, P<0,001 a Quattro és az SC40 esetében). A caecumban a claudin-3 fehérjére vonatkozóan sem találtunk szignifikáns eltérést a butiráttal kezelt és a kontroll csoport között.

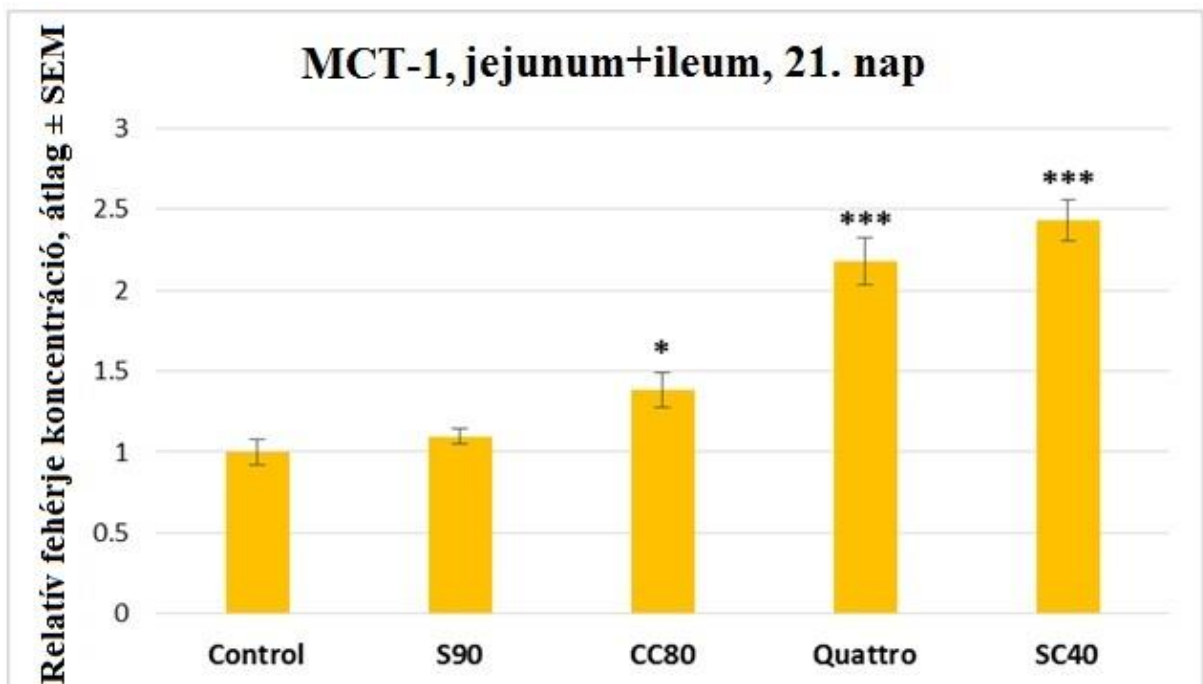
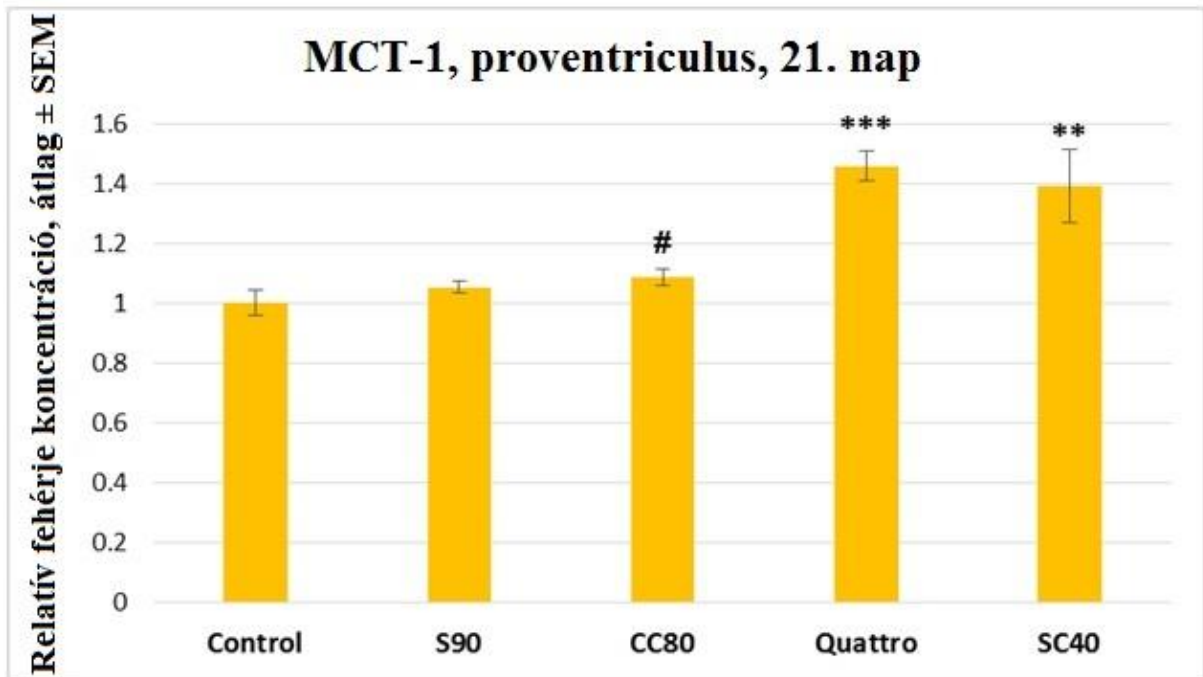


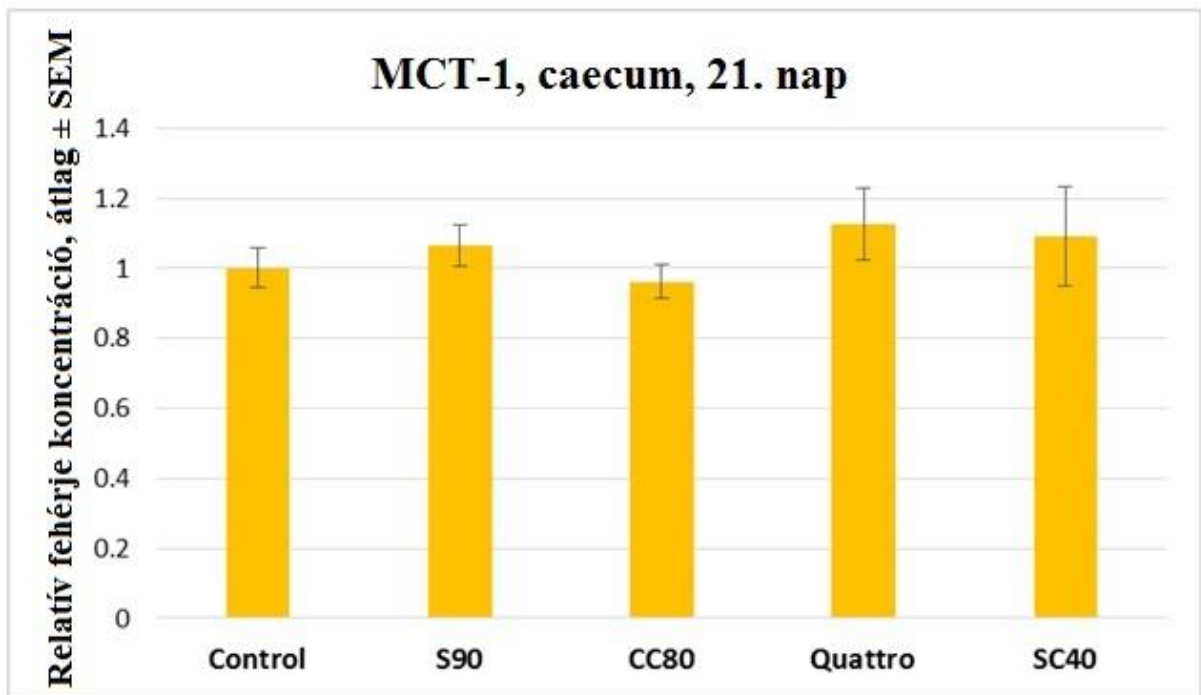


4. ábra A claudin-3 relatív fehérjeexpressziója a gyomor-bélrendszer különböző szakaszainak nyálkahártyájában a 21. napon (a kontrollok expresszióját 1-nek tekintve). # $P < 0,10$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ és *** $P < 0,001$ a kontrollokhoz képest.

5.3. MCT-1 fehérje expresszió

A 21. napon a proventriculus nyálkahártyájában a Quattro és az SC40 termékek szignifikánsan növelték az MCT-1 fehérjekoncentrációt ($P < 0,001$, illetve $P = 0,008$), míg a CC80 ugyancsak növekvő tendenciát mutatott ($P = 0,092$). A jejunum+ileum mintákban a CC80, Quattro és SC40 kezelések hatására szignifikáns emelkedést figyeltünk meg az MCT-1 koncentrációban ($P = 0,012$ a CC80 esetében és $P < 0,001$ a Quattro és SC40 esetében). A caecumban nem volt különbség a butiráttal kezelt és a kontroll állatok között.

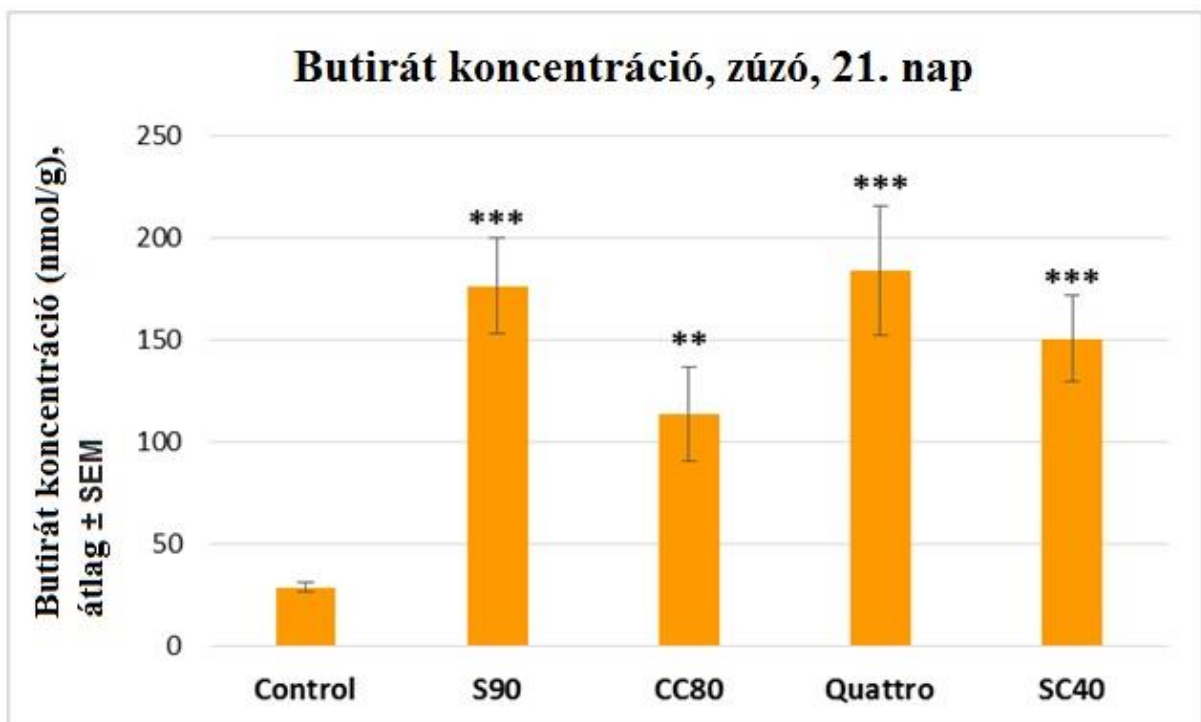


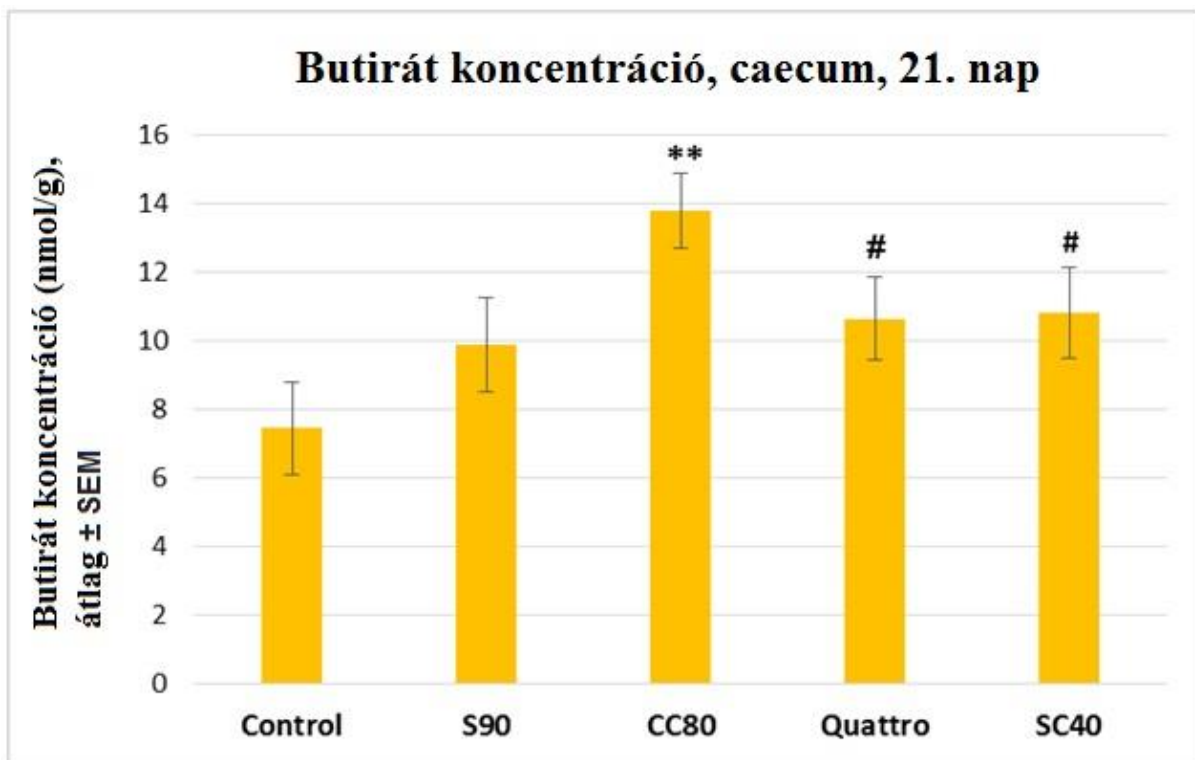
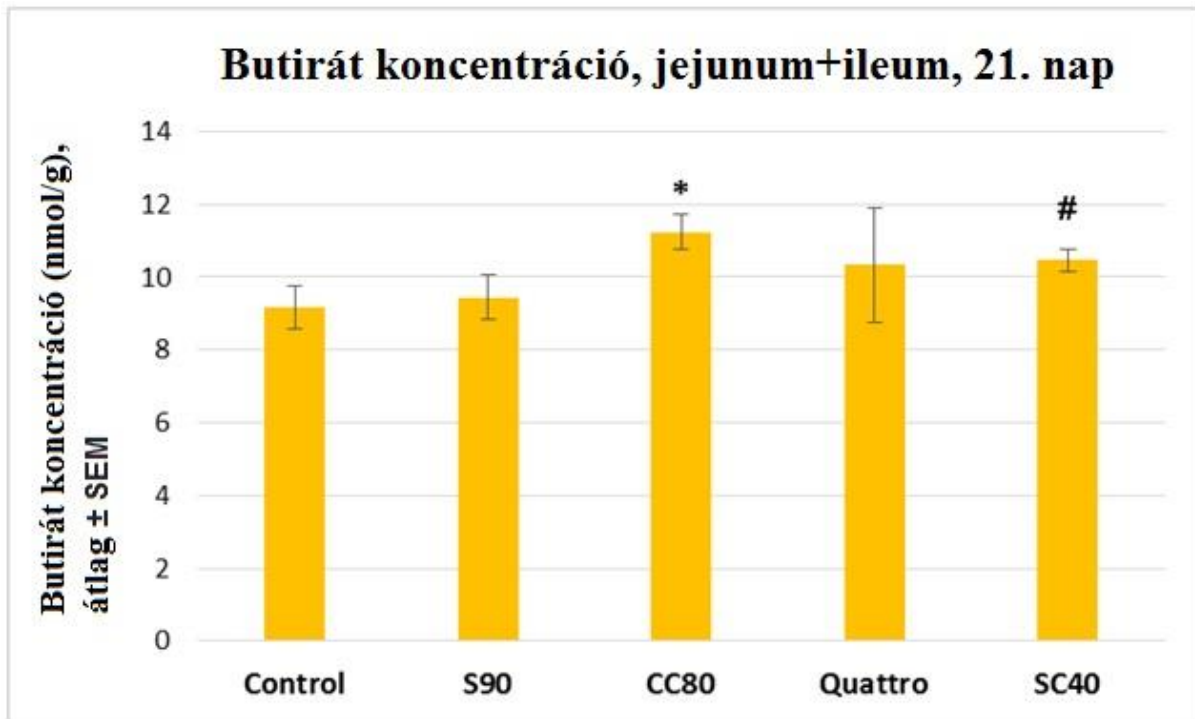


5. ábra Az MCT-1 relatív fehérjeexpressziója a gyomor-bélrendszer különböző szakaszainak nyálkahártyájában a 21. napon (a kontrollok expresszióját 1-nek tekintve). # $P < 0,10$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ és *** $P < 0,001$ a kontrollokhöz képest.

5.4. Béltartalom beli butirát koncentráció

Valamennyi alkalmazott butirátkészítmény szignifikánsan, erősen megemelte a butirát-tartalmat a zúzógyomorban. (P=0,002 a CC80 esetében és P<0,001 az összes többi butirát termék esetében). A jejunumból és az ileumból származó béltartalom esetében csak a CC80 mutatott szignifikáns növekedést, míg az SC40 a butirát-tartalom marginálisan szignifikáns emelkedését okozta (P=0,016 és P=0,063). A caecumban a CC80 alkalmazása szignifikánsan növelte (P=0,002), míg a Quattro és az SC40 marginálisan szignifikáns szinten növelte a bél butirátkoncentrációját (P=0,098 és P=0,094).





6. ábra Butirát koncentráció a gyomor-bélrendszer különböző szakaszainak ingesta-anyagaiban a 21. napon. # $P < 0,10$, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ és *** $P < 0,001$ a kontrollokhoz képest.

6. Megbeszélés

A modern mezőgazdaságban manapság fontosabb az innováció, mint valaha. Egyre több gondot jelent a jól hasznosítható termőföld hiánya, a növekvő igény, a szállítási költségek emelkedése és a munkaerőhiány a mezőgazdaság minden ágazatában. Szükségserűvé vált új módszerek kutatása és alkalmazása a fenntartható mezőgazdaság megteremtése és biztosítása érdekében. Ennek megfelelően egy megoldást jelenthet a vertikális gazdálkodás, ahol beltéri szabályozott körülmények között kisebb alapterületen lehet élelmiszert előállítani (Chaudhry et al., 2019). Emellett a munkaerőhiány és a termelési költségek emelkedése következtében elterjedőben van az automatizált mezőgazdaság a robotizált rendszereknek köszönhetően (Edan et al., 2009). Az állattenyésztésben szintén nagyfokú fejlődés zajlott le az utóbbi időkben a termelés maximális kihasználása érdekében. A hibrid fajták létrehozása, a takarmányozás optimalizálása, az állatjólét biztosítása mind olyan faktorok, melyek nélkül nem lehetne magas szintű állattenyésztést folytatni (Thornton, 2010).

Az antibiotikumok és hormonok hozamfokozóként való alkalmazásának betiltását követően azonban a takarmány-kiegészítők terén is egyre több kutatás zajlik manapság. (Gopi, 2013). A fent említetteknek megfelelően kiemelt jelentősége van az SCFA alapú kiegészítőknek, valamint ezen belül a butirátnak, ezért a jelen dolgozatban bemutatott kísérletben is ez utóbbi sejtszintű hatásait kívántuk részletesen vizsgálni.

Különböző biológiai hatásai alapján ismert, hogy a butirát javítja a brojlercsirkék növekedési teljesítményét, ami a testtömeg-gyarapodás növekedésében és az FCR-értékek csökkenésében nyilvánul meg (Hu és Guo, 2007). Arról is beszámoltak, hogy a mikrokapszulázott butirát és vajsavgliceridek növelték a brojlercsirkék hasított testtömegét és mellhúshozamát (Mátis et al., 2019; Leeson et al., 2005), amelyek hatása még kifejezettebbé vált szuboptimális egészségügyi körülmények között, például *Eimeria* vagy *Escherichia coli* fertőzés esetén (Zhang et al., 2011; Leeson et al., 2005)

Jelen vizsgálatunk megerősítette, hogy a takarmány-kiegészítőként szájon át alkalmazott védett butirát képes a bélfal integritását módosítani a tight junction fehérjéinek, a claudin-1 és -3 expressziójának megváltoztatásával brojlercsirkékben. Hangsúlyozni kell azonban, hogy az egyes bélszegmensek között jelentős különbségeket figyeltünk meg.

A 21. napon minden alkalmazott termék jelentős, intenzív emelkedést okozott mind a claudin-1, mind a claudin-3 expressziójára a proventriculus és a jejunum+ileum nyálkahártyájában. A claudin-1 esetében minden butirátkezelés jelentős up-regulációt idézett

elő a proventriculusban, amelynek mértéke kb. 10% és 50% között mozgott, ahol az SC40 kezelés volt a legerősebb hatású. Hasonlóképpen, mind a négy kezelés jelentősen, kb. 20%-kal emelte a claudin-1 szintjét a jejunum+ileumban. A claudin-3 tekintetében szignifikánsan, kb. 10-30%-kal megnövekedett fehérjekoncentrációt észleltünk a proventriculusban az összes butirátnak kitett csoportban, míg a jejunum+ileumban a Quattro és az SC40 fokozta a legintenzívebben a claudin-3 szintjét (kb. 40%-kal). A caecumban a claudin-1 és -3 koncentrációjában nem figyeltünk meg szignifikáns változást.

Eredményeink alapján a szájon át alkalmazott butirát serkentő hatást gyakorolhat a bélrendszeri tight junction fehérjék kifejeződésére a proventriculusban, valamint a jejunumban és az ileumban brojlercsirkékben a növekedési fázisban, amikor az állatok gyarapodása különösen intenzív. Ezek a hatások nagy jelentőségűek lehetnek azért, hogy javítják a bélbarrier funkciót az intenzív növekedés fázisában, védik a bélfalat az enterális fertőzésekből származó mikrosérülésektől és megakadályozzák a nemkívánatos anyagok felszívódását. (Wang et al., 2012). Adataink összhangban vannak a korábbi eredményekkel, amelyek a butirátnak a claudin génexpresszióra gyakorolt növekvő szerepére utalnak (Song és mtsai., 2017, 2018). Ezek a korábbi tanulmányok azonban a szájon át alkalmazott mikrokapszulázott butirát hatását vizsgálták nekrotikus bélgyulladásban szenvedő csirkéknél (Song és mtsai., 2017), illetve a butirát inulin által kiváltott bélrendszer gyulladás közvetítő szerepét (Song és mtsai., 2018). Ami az egyéb bélszakaszokat illeti, a butirátnak a claudin-3-ra és az occludinra gyakorolt serkentő szerepét igazolták elválasztott malacok vastagbélében (Feng et al., 2018), és a vastagbél tight junction fehérjéinek butirát által kiváltott átrendeződése hozzájárulhat továbbá a butirát védő szerepéhez egyes, emberekben előforduló gyulladásos bélbetegségekben is (Silva et al., 2018). Sertésekkel végzett további kutatásokban is megfigyelték, hogy a butirát sokoldalúan befolyásolhatja a tight junction fehérje expresszióját. Például mRNS szinten az occludin génexpressziója növekedett a duodenumban, míg a claudin-1 génexpressziója csökkent volt az elválasztott sertések duodenumában, jejunumában és ileumában, amelyeket nátrium-butirát kiegészítéssel (0,96 g/kg takarmány) pre-starter táppal etettek (Grilli et al., 2016). Hasonlóan, mint ahogy a jelen vizsgálatban a caecum nyálkahártyában nem történt a védett butirát által kiváltott szignifikáns claudin koncentráció változás, a sertés vastagbélben a szájon át alkalmazott butirát szintén nem befolyásolta a tight junction fehérjék expresszióját (Grilli et al., 2016). A claudin-expresszió serkentésén kívül a butirát az AMP-aktivált protein-kináz kalcium/kalmodulin-függő protein-kináz β által közvetített aktiválásán keresztül felgyorsítja a szoros kötések létrejöttét is, ahogyan arról a Caco-2 vastagbél sejtvonalon

beszámoltak (Miao et al., 2016), ami szintén kritikus a bélhám integritása szempontjából. Ezért a jelen vizsgálat újszerű adatokat szolgáltatott a szájon át adott védett butirát termékek fehérjeszinten monitorozott claudin-expresszióra gyakorolt hatásáról egészséges csirkékben, az emésztő traktus 3 különböző szakaszának szűrésével.

Mivel a butirátnak nem csak a bélrendszerre korlátozódó, de extraintesztinális hatásai is ismertek, jelen tanulmányban a felszívódás intenzitásának befolyásolásában fontos szereppel bíró MCT-1, mint fő SCFA-transzporter kifejeződését is vizsgáltuk. Az alkalmazott butirátkiegészítés többsége jelentősen megemelte az MCT-1 fehérjeszintjét a proventriculusban és a jejunum+ileumban a 21. napon. Ez a serkentő hatás a jejunalis és ilealis nyálkahártyában volt a legkifejezettebb, ahol a Quattro és az SC40 termékek az MCT-1 expressziójának erőteljes, több mint kétszeresét meghaladó stimulációját váltották ki. A további emésztő traktus szakaszaiban a transzporter többnyire mérsékelt down regulációja volt kimutatható. A megfigyelt claudinokhoz hasonlóan a butirát MCT-1 termelődését fokozó hatása a proventriculusban és a jejunum+ileumban volt a legszembetűnőbb (ezzel szemben a caecumban nem észleltünk változást vagy enyhe csökkenést figyeltünk meg a koncentrációjában). A butirát által kiváltott MCT-1 koncentráció növekedés hozzájárulhat a butirát gyorsabb és hatékonyabb felszívódásához és ezáltal a bélből történő kifejezett butirát felszabaduláshoz, ami erősen meghatározza annak extraintesztinális hatásait. Hasonló eredményeket talált kutatócsoportunk egy korábbi vizsgálatában is, ahol a nem védett nátrium-butirát étrendkiegészítés és a búza alapú takarmány (a bélbaktériumok butiráttermelésének serkentésén túl) jelentősen növelte az MCT-1 fehérje expresszióját az ileumban (Borda-Molina et al., 2020). Az a megállapítás, hogy a butirát eltérő módon hatott a proventriculusban, a jejunum+ileumban és a caecumban szintén figyelemre méltó, kiemelve, hogy a butirát többféle módon, sokrétű hatásmechanizmusokon keresztül hathat az emésztő traktus különböző részeiben. Az eredmények szintén összhangban vannak a más kutatócsoportok által is megfigyelt, butirát hatására kiváltott intenzív MCT-1 koncentrációemelkedéssel humán vastagbél epitelsejtekben (Cuff et al., 2002). Egy másik brojleren zajlott kísérlet során a duodenumban fellelhető számos különböző MCT gén (MCT-1, -2-, -8, -9, -10 és -14) és a bélrendszerben lévő butirát koncentrációja között találtak pozitív korrelációt. Másrészt ugyanebben a kutatásban azt találták, hogy az ileumban a fentiekkel ellentétesen, az MCT-9 gén expresszióját csökkenti a butirát (Moquet, 2018).

Az emésztő traktusban jelenlévő butirát koncentrációjának növekedése azonban egyik korábbi kísérletben sem befolyásolta az MCT expresszióját a gyomor régióban (proventriculus, pylorus). A gyomorban található béltartalom pH-ja általában alacsonyabb, mint a butirát pKa

(savi disszociációs állandó) értéke (Denbow, 2000). Következésképpen a butirát többnyire nem ionizált (protonált) formában van jelen a madarak gyomor régiójában (Moquet et al., 2016). A nem ionizált butirát passzívan diffundálhat a gyomor falon keresztül (Walter és Gutknecht, 1984). Ez magyarázhatja azt is, hogy miért nem figyeltük meg a gyomor régióban a butirát MCT fehérjére mennyiségére gyakorolt hatását. Ezzel szemben a gyomrot követő bélszakaszokban uralkodó pH-ja magasabb, mint a butirát pKa értéke (Denbow, 2000), mely azt jelenti, hogy a butirát többnyire ionizált formában fordul elő ebben a GIT szegmensben (Moquet et al., 2016). Ebből az okból kifolyólag szükség van olyan transzporterekre, mint az MCT-1, hogy a butirátot a bélfalon keresztül szállíthassák, így megvalósítva annak hatékony felszívódását (Astbury és Corfe, 2012). Fontos megjegyezni továbbá, hogy eddigi megfigyelések alapján transzporterek azonban szinte teljesen hiányoznak a kiegészített butirát nélkül táplált emlősök duodenális bélnyálkahártyából (Gill et al., 2005).

Az alkalmazott kezelések felszívódási tulajdonságainak értékelése érdekében a béltartalom butirátkoncentrációját is meghatároztuk. A kapott adatok alapján a butirátkezelt csirkék béltartalmában a butirát koncentrációja szignifikánsan megemelkedett a proventriculusban, míg a távolabbi szakaszokban csak véletlenszerű emelkedést találtunk a kontrollokhöz képest. E megfigyelés alapján az alkalmazott termékekből származó butirát elsősorban a vékonybél proximális részeiből (duodenum, proximális jejunum) szívódik fel. Eredményeink összhangban vannak a Palital® termékekkel végzett korábbi vizsgálatok eredményeivel, megerősítve, hogy ezek a termékek jó butirátellátást biztosítanak a vékonybél számára.

Mivel a caecumban lévő SCFA-t általában a rezidens mikrobióta termeli, ezért feltételezhető, hogy a caecum SCFA-koncentrációjának növekedése a védett butirát készítmények következtében az endogén mikrobiális termelés stimulációjának köszönhető. E feltételezést támasztja alá az is, hogy brojlerek vakbél mikroflórájának általános összetételét hatékonyan lehetett módosítani 21 napos korban szájon át történő nátrium-butirát-kiegészítéssel egy korábbi vizsgálatban (Borda-Molina et al., 2020). Ugyanakkor a hátsó bélszakasz mikrobáinak több szubsztrát szállítása rostban gazdag búzaalapú takarmánnyal erősebb stimulációt jelentett a baktériumközösségekre, mint a szájon át adagolt butirát (Borda-Molina et al., 2020). Ennek alapján feltételezhető, hogy a megnövekedett mikrobiális aktivitással függ össze a megnövekedett endogén SCFA termelés, melynek hátterében az állhat, hogy a butirát-kiegészítés emésztési hatékonyságot növelő képessége a gyomor és a vékonybél fokozott

emésztőenzim szekréciójával jár (Guilloteau et al., 2010). Ez valószínűleg megváltoztatja a vastagbélbe jutó fermentálható anyagot, ami módosíthatja a mikrobiális aktivitást.

Összességében kijelenthetjük tehát, hogy a dolgozatban bemutatott kutatás számos jelentős és új információval szolgál a butirát alapú takarmánykiegészítők hatásmechanizmusának felderítése kapcsán. Munkánk hozzájárulhat továbbá újszerű takarmányozási stratégiák kidolgozásához, melyek nagy jelentőséggel bírhatnak a fenntartható mezőgazdaság és hatékony állattenyésztés, valamint állati termék előállítás biztosítása szempontjából. A fentieknél fogva eredményeink mind alaptudományi, mint alkalmazott kutatási szempontok alapján is hasznosak lehetnek a későbbiek folyamán az állatorvoslás, valamint a takarmányozás területén.

7. Összefoglalás

A rövid szénláncú szerves savakat (Short Chain Fatty Acids, SCFA) ezen belül is leginkább a négy szénatomból álló szerves savat, a butirátot (vajsav) és annak sóit manapság előszeretettel használják a hústermelő ágazatban, így a baromfitakarmányozásban is a hozamfokozásra használt antibiotikumok és hormonok alternatívájaként.

A butirát számos intesztinális és extraintesztinális hatása ismert. Hatással van a pro-inflammatorikus citokinek termelésére, egyes antioxidáns enzimek aktivitására és a lipid peroxidációra. Hiszton acetiláción keresztül befolyásolja a transzkripciót. Az inzulin receptor β expressziójának szelektív szabályozásában és inzulin rezisztencia kezelésében és megelőzésében is hatásos. Pozitív hatással van a növekedési teljesítményre, javítja a takarmány-hasznosulást, csökkenti a pH-t a proximális emésztő traktusban, energiaforrásként szolgál a bélben lévő mikrobióták illetve colonocyták számára. A pH-val szoros összefüggésben képes szabályozni a bélben lévő mikrobióta mennyiségét. Más kísérletek már kimutatták a butirát bélintegritásra gyakorolt pozitív hatását a tight junction fehérjék megnövekedett expressziója révén többnyire in vitro kísérletekben. Egyúttal fokozza az MCT-1 transzport fehérje expresszióját is.

A vizsgálatunk célja a claudin-1 és -3 tight junction fehérjék, valamint az MCT-1 transzportfehérje koncentráció változásának nyomonkövetése volt különböző butirát tartalmú takarmánykiegészítők hatására. El kívántuk végezni továbbá a béltartalom butirát koncentrációjának mérését is a különböző bélszakaszokban.

Összefoglalva, a jelen vizsgálat megerősítette a szájon át adott védett butirát termékek pozitív hatását a brojlercsirkék claudin-expressziójára. Valamennyi alkalmazott termék növelte a claudin-1 és -3 tight junction fehérjék, valamint az MCT-1 SCFA-transzporter expresszióját a proventriculusban és a jejunum+ileumban a növendékfázisban (21. nap), javítva a bélrendszer integritását és a butirát felszívódását. A caecumban azonban nem mértük a claudin-1 és claudin-3 tight junction fehérjék szignifikáns változását.

Eredményeink alapján a butirát-kiegészítés számos, már leírt előnyös hatása mellett hatékonyan hozzájárulhat a jobb bélegészséghez, ami nagy jelentőséggel bír a gazdaságos baromfitermelés szempontjából. Kapott eredményeink mind alaptudományi, mind alkalmazott, gyakorlati hasznosulás szempontból értékesek lehetnek a jövőbeni új takarmányozási stratégiák kidolgozása kapcsán.

8. Summary

Short Chain Fatty Acids (SCFA), most notably the four-carbon organic acid butyrate (butyric acid) and its salts, are nowadays widely used in the meat sector, including poultry feeding, as an alternative to antibiotics and hormones formerly used to increase yields.

Butyrate is known to have a number of intestinal and extraintestinal effects. Therefore it affects the production of pro-inflammatory cytokines, the activity of certain antioxidant enzymes and lipid peroxidation, as well as modulates transcription through histone acetylation. It is also effective in selectively regulating insulin receptor β expression and may be successfully applied in the treatment and prevention of insulin resistance. Furthermore, butyrate has positive effects on growth performance, improves feed utilisation, lowers pH in the proximal digestive tract, provides energy source for microbiota and colonocytes in the gut. It can regulate the amount of microbiota in the gut in close relation to alteration and stabilization of pH levels. Other experiments have already demonstrated the positive effect of butyrate on intestinal integrity through increased expression of tight junction proteins, mostly in in vitro experiments. It also increases the expression of the MCT-1 transport protein, and greatly increases protein digestibility due to more efficient nitrogen utilisation. Further studies have already shown the positive effect of butyrate on intestinal integrity through increased expression of tight junction proteins, while it also increases the expression of the MCT-1 transport protein.

The aim of our study was to monitor the changes in the levels of claudin-1 and -3 tight junction proteins and MCT-1 transport protein in response to different butyrate-containing feed supplements. We also wished to measure the concentration of butyrate in the intestinal contents of different gastrointestinal sections.

In conclusion, the present study confirmed the positive effect of orally administered proprietary butyrate products on claudin expression in broiler chickens. All the applied products increased the expression of claudin-1 and -3 tight junction proteins and MCT-1 SCFA transporter in the proventriculus and jejunum+ileum during the growth phase (day 21), improving intestinal integrity and butyrate absorption. However, no significant changes in claudin-1 and claudin-3 tight junction proteins were measured in the caecum.

Our results suggest that butyrate supplementation, in addition to several already described beneficial effects, may be effective in improving gut health, which is of great importance for economical as well as animal health aspects of poultry production. Our results can be valuable

from both a basic science and an applied, practical utility point of view and facilitates the development of new feeding strategies in the future.

9. Irodalomjegyzék

Ackman, Robert George. Marine Biogenic Lipids, Fats & Oils. CRC Press, 1989.

Aletor, Valentine, II Hamid, E Nieß, és E Pfeffer. „Low-protein amino acid-supplemented diets in broiler chickens: Effects on performance, carcass characteristics, whole-body composition and efficiencies of nutrient utilisation”. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 80 (2000. július 6.): 547–54. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(200004\)80:5<547::AID-JSFA531>3.0.CO;2-C](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(200004)80:5<547::AID-JSFA531>3.0.CO;2-C).

Astbury, Stuart M., és Bernard M. Corfe. „Uptake and Metabolism of the Short-Chain Fatty Acid Butyrate, a Critical Review of the Literature”. *Current Drug Metabolism* 13, sz. 6 (2012. július): 815–21. <https://doi.org/10.2174/138920012800840428>.

Aviagen (2014) Broiler Management Handbook: Ross 308. Aviagen Ltd., Newbridge, UK.

Binder, H. J., és P. Mehta. „Short-Chain Fatty Acids Stimulate Active Sodium and Chloride Absorption in Vitro in the Rat Distal Colon”. *Gastroenterology* 96, sz. 4 (1989. április): 989–96. [https://doi.org/10.1016/0016-5085\(89\)91614-4](https://doi.org/10.1016/0016-5085(89)91614-4).

Borda-Molina, D., Mackei, M., Burbach, K., Mátis, G., Schadt, S., Seifert, J., Huber, K., Fébel, H., Neogrády, Zs. & Camarinha-Silva, A. (2020) Effects of dietary factors on gut microbiota and intestinal monocarboxylate transporter MCT1 expression in broiler chicken. *BMC Veterinary Research*, submitted for publication.

Chamba, F.; Puyalto, M.; Ortiz, A.; Torrealba, H.; Mallo, J.J.; Riboty, R., 2014: Effect of partially protected sodium butyrate on performance, digestive organs, intestinal villi and *E. coli* development in broilers chickens. *International Journal of Poultry Science* 13, 390–396.

Chaudhry, Amna Rafi, és Ved P Mishra. „A Comparative Analysis of Vertical Agriculture Systems in Residential Apartments”. In 2019 Advances in Science and Engineering Technology International Conferences (ASET), 1–5, 2019. <https://doi.org/10.1109/ICASET.2019.8714358>.

Cowan, W. D., A. Korsbak, T. Hastrup, és P. B. Rasmussen. „Influence of added microbial enzymes on energy and protein availability of selected feed ingredients”. *Animal Feed Science and Technology*, N. American Nutrition Conferences IV, 60, sz. 3 (1996. augusztus 1.): 311–19. [https://doi.org/10.1016/0377-8401\(96\)00986-8](https://doi.org/10.1016/0377-8401(96)00986-8).

Cuff, M.A., Lambert, D.W. and Shirazi-Beechey, S.P. (2002), Substrate-induced regulation of the human colonic monocarboxylate transporter, MCT1. *The Journal of Physiology*, 539: 361-371. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2001.014241>

Dai, Dong, Kai Qiu, Hai-jun Zhang, Shu-geng Wu, Yan-ming Han, Yuan-yuan Wu, Guang-hai Qi, és Jing Wang. „Organic Acids as Alternatives for Antibiotic Growth Promoters Alter the Intestinal Structure and Microbiota and Improve the Growth Performance in Broilers”. *Frontiers in Microbiology* 11 (2021). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2020.618144>.

Denbow, Dm. „Chapter 14. Gastrointestinal Anatomy and Physiology”. *Sturkie's Avian Physiology*, 2000. december 31. <https://doi.org/10.1016/B978-012747605-6/50013-4>.

Edan, Yael, Shufeng Han, és Naoshi Kondo. „Automation in Agriculture”. In *Springer Handbook of Automation*, szerkesztette Shimon Y. Nof, 1095–1128. Springer Handbooks. Berlin, Heidelberg: Springer, 2009. https://doi.org/10.1007/978-3-540-78831-7_63.

Feng, Wenqian, Yancheng Wu, Guangxin Chen, Shoupeng Fu, Bai Li, Bingxu Huang, Dali Wang, Wei Wang, és Juxiong Liu. „Sodium Butyrate Attenuates Diarrhea in Weaned Piglets and Promotes Tight Junction Protein Expression in Colon in a GPR109A-Dependent Manner”. *Cellular Physiology and Biochemistry* 47, sz. 4 (2018. június 27.): 1617–29. <https://doi.org/10.1159/000490981>.

Fujimoto, Toyoshi, és Robert G. Parton. „Not Just Fat: The Structure and Function of the Lipid Droplet”. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, sz. 3 (2011. január 3.): a004838. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004838>.

Gao, Zhanguo, Jun Yin, Jin Zhang, Robert E. Ward, Roy J. Martin, Michael Lefevre, William T. Cefalu, és Jianping Ye. „Butyrate Improves Insulin Sensitivity and Increases Energy Expenditure in Mice”. *Diabetes* 58, sz. 7 (2009. július): 1509–17. <https://doi.org/10.2337/db08-1637>.

Gill, Ravinder K., Seema Saksena, Waddah A. Alrefai, Zaheer Sarwar, Jay L. Goldstein, Robert E. Carroll, Krishnamurthy Ramaswamy, és Pradeep K. Dudeja. „Expression and Membrane Localization of MCT Isoforms along the Length of the Human Intestine”. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* 289, sz. 4 (2005. október): C846-852. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00112.2005>.

Gonzalez Ronquillo, Manuel, és Juan Carlos Angeles Hernandez. „Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods”. Food Control, FAO/IAEA International Symposium on Food Safety and Quality: Applications of Nuclear and Related Techniques, Vienna, Austria, 10-13 November 2014, 72 (2017. február 1.): 255–67. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.001>.

M., Gopi. „Essential Oils as a Feed Additive in Poultry Nutrition”. Advances in Animal and Veterinary Sciences 2 (2013. október 31.): 1–7. <https://doi.org/10.14737/journal.aavs/2014.2.1.1.7>.

Grilli, E., B. Tugnoli, C.J. Foerster, és A. Piva. „Butyrate modulates inflammatory cytokines and tight junctions components along the gut of weaned pigs”. Journal of Animal Science 94, sz. suppl_3 (2016. szeptember 1.): 433–36. <https://doi.org/10.2527/jas.2015-9787>.

Guilloteau, P., L. Martin, V. Eeckhaut, R. Ducatelle, R. Zabielski, és F. Van Immerseel. „From the Gut to the Peripheral Tissues: The Multiple Effects of Butyrate”. Nutrition Research Reviews 23, sz. 2 (2010): 366–84. <https://doi.org/10.1017/S0954422410000247>.

Halestrap, Andrew P. „The Monocarboxylate Transporter Family—Structure and Functional Characterization”. IUBMB Life 64, sz. 1 (2012): 1–9. <https://doi.org/10.1002/iub.573>.

Hanim, C., N. D. Dono, B. Ariyadi, M. F. Habibi, M. Al Anas, és M. F. Hanif. „Effect of Protected Sodium Butyrate on Growth Performance, Carcass Traits, Relative Weight of Digestive Organs and Intestinal Histomorphology of Broilers”. Journal of Animal and Feed Sciences, 2023. június 25. <https://doi.org/10.22358/jafs/166080/2023>.

Hu, Zhonghong, és Yuming Guo. „Effects of dietary sodium butyrate supplementation on the intestinal morphological structure, absorptive function and gut flora in chickens”. Animal Feed Science and Technology 132, sz. 3 (2007. január 15.): 240–49. <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.03.017>.

Józefiak, D., S. Kaczmarek, A. Rutkowski, A. Józefiak, B. B. Jensen, és R. M. Engberg. „Fermentation in Broiler Chicken Gastrointestinal Tract as Affected by High Dietary Inclusion of Barley and by β -Glucanase Supplementation”. Journal of Animal and Feed Sciences 14, sz. 4 (2005. október 17.): 695–704. <https://doi.org/10.22358/jafs/67156/2005>.

Józefiak, D., A. Rutkowski, B.B. Jensen, és R.M. Engberg. „The effect of β -glucanase supplementation of barley- and oat-based diets on growth performance and fermentation in

broiler chicken gastrointestinal tract”. *British Poultry Science* 47, sz. 1 (2006. február 1.): 57–64. <https://doi.org/10.1080/00071660500475145>.

Karoor, Vijaya, Derek Strassheim, Timothy Sullivan, Alexander Verin, Nagavedi S. Umopathy, Edward C. Dempsey, Daniel N. Frank, Kurt R. Stenmark, és Evgenia Gerasimovskaya. „The Short-Chain Fatty Acid Butyrate Attenuates Pulmonary Vascular Remodeling and Inflammation in Hypoxia-Induced Pulmonary Hypertension”. *International Journal of Molecular Sciences* 22, sz. 18 (2021. január): 9916. <https://doi.org/10.3390/ijms22189916>.

Kulcsár, Anna, Gábor Mátis, Andor Molnár, Janka Petrilla, László Wágner, Hedvig Fébel, Ferenc Husvéth, Károly Dublec, és Zsuzsanna Neogrády. „Nutritional Modulation of Intestinal Drug-Metabolizing Cytochrome P450 by Butyrate of Different Origin in Chicken”. *Research in Veterinary Science* 113 (2017): 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2017.07.033>.

Lee, Jessica Y., Valerie C. Wasinger, Yunki Y. Yau, Emil Chuang, Vijay Yajnik, és Rupert WL Leong. „Molecular Pathophysiology of Epithelial Barrier Dysfunction in Inflammatory Bowel Diseases”. *Proteomes* 6, sz. 2 (2018. június): 17. <https://doi.org/10.3390/proteomes6020017>.

Leeson, S., H. Namkung, M. Antongiovanni, és E. H. Lee. „Effect of butyric acid on the performance and carcass yield of broiler chickens”. *Poultry Science* 84, sz. 9 (2005. szeptember 1.): 1418–22. <https://doi.org/10.1093/ps/84.9.1418>.

Mátis, G., A. Kulcsár, V. Turowski, H. Fébel, Zs Neogrády, és K. Huber. „Effects of Oral Butyrate Application on Insulin Signaling in Various Tissues of Chickens”. *Domestic Animal Endocrinology* 50 (2015): 26–31. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2014.07.004>.

Mátis, Gábor, Zsuzsanna Neogrády, György Csikó, Anna Kulcsár, Ákos Kenéz, és Korinna Huber. „Effects of orally applied butyrate bolus on histone acetylation and cytochrome P450 enzyme activity in the liver of chicken – a randomized controlled trial”. *Nutrition & Metabolism* 10, sz. 1 (2013. január 22.): 12. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-10-12>.

Mátis, Gábor, Janka Petrilla, Anna Kulcsár, Henry van den Bighelaar, Bart Boomsma, Zsuzsanna Neogrády, és Hedvig Fébel. „Effects of Dietary Butyrate Supplementation and Crude Protein Level on Carcass Traits and Meat Composition of Broiler Chickens”. *Archives Animal Breeding* 62, sz. 2 (2019. szeptember 2.): 527–36. <https://doi.org/10.5194/aab-62-527-2019>.

McNabney, Sean M., és Tara M. Henagan. „Short Chain Fatty Acids in the Colon and Peripheral Tissues: A Focus on Butyrate, Colon Cancer, Obesity and Insulin Resistance”. *Nutrients* 9, sz. 12 (2017. december): 1348. <https://doi.org/10.3390/nu9121348>.

Miao, Wei, Xiujuan Wu, Kang Wang, Wenjing Wang, Yumei Wang, Zhigang Li, Jingjing Liu, Li Li, és Luying Peng. „Sodium Butyrate Promotes Reassembly of Tight Junctions in Caco-2 Monolayers Involving Inhibition of MLCK/MLC2 Pathway and Phosphorylation of PKC β 2”. *International Journal of Molecular Sciences* 17, sz. 10 (2016. október): 1696. <https://doi.org/10.3390/ijms17101696>.

Moquet, Pierre C. A. „Butyrate in Broiler Diets: Impact of Butyrate Presence in Distinct Gastrointestinal Tract Segments on Digestive Function, Microbiota Composition and Immune Responses”, 2018. <https://doi.org/10.18174/449961>.

Moquet, P. C. A., L. Onrust, F. Van Immerseel, R. Ducatelle, W. H. Hendriks, és R. P. Kwakkel. „Importance of Release Location on the Mode of Action of Butyrate Derivatives in the Avian Gastrointestinal Tract”. *World's Poultry Science Journal* 72, sz. 1 (2016. március): 61–80. <https://doi.org/10.1017/S004393391500269X>.

Onrust, Lonneke, Richard Ducatelle, Karolien Van Driessche, Celine De Maesschalck, Karen Vermeulen, Freddy Haesebrouck, Venessa Eeckhaut, és Filip Van Immerseel. „Steering Endogenous Butyrate Production in the Intestinal Tract of Broilers as a Tool to Improve Gut Health”. *Frontiers in Veterinary Science* 2 (2015). <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2015.00075>.

Panda, A. K., S. V. Rama Rao, M. V. L. N. Raju, és G. Shyam Sunder. „Effect of Butyric Acid on Performance, Gastrointestinal Tract Health and Carcass Characteristics in Broiler Chickens”. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 22, sz. 7 (2009. június 25.): 1026–31.

Qaisrani, S. N., M. M. van Krimpen, R. P. Kwakkel, M. W. A. Verstegen, és W. H. Hendriks. „Diet structure, butyric acid, and fermentable carbohydrates influence growth performance, gut morphology, and cecal fermentation characteristics in broilers”. *Poultry Science* 94, sz. 9 (2015. szeptember 1.): 2152–64. <https://doi.org/10.3382/ps/pev003>.

Raso, Giuseppina Mattace, Raffaele Simeoli, Roberto Russo, Anna Iacono, Anna Santoro, Orlando Paciello, Maria Carmela Ferrante, Roberto Berni Canani, Antonio Calignano, és Rosaria Meli. „Effects of Sodium Butyrate and Its Synthetic Amide Derivative on Liver Inflammation and Glucose Tolerance in an Animal Model of Steatosis Induced by High Fat

Diet”. PLOS ONE 8, sz. 7 (2013. július 5.): e68626.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068626>.

Silva, João P. B., Kely C. Navegantes-Lima, Ana L. B. Oliveira, Dávila V. S. Rodrigues, Sílvia L. F. Gaspar, Valter V. S. Monteiro, Davi P. Moura, és Marta C. Monteiro. „Protective Mechanisms of Butyrate on Inflammatory Bowel Disease”. *Current Pharmaceutical Design* 24, sz. 35 (é. n.): 4154–66.

Song, Bochen, Huixian Li, Yuanyuan Wu, Wenrui Zhen, Zhong Wang, Zhaofei Xia, és Yuming Guo. „Effect of microencapsulated sodium butyrate dietary supplementation on growth performance and intestinal barrier function of broiler chickens infected with necrotic enteritis”. *Animal Feed Science and Technology* 232 (2017. október 1.): 6–15.
<https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.07.009>.

Song, Jiao, Qinghe Li, Peng Li, RanRan Liu, Huanxian Cui, Maiqing Zheng, Nadia Everaert, Guiping Zhao, és Jie Wen. „The Effects of Inulin on the Mucosal Morphology and Immune Status of Specific Pathogen-Free Chickens”. *Poultry Science* 97, sz. 11 (2018): 3938–46. <https://doi.org/10.3382/ps/pey260>.

Thornton, Philip K. „Livestock production: recent trends, future prospects”. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, sz. 1554 (2010. szeptember 27.): 2853–67. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0134>.

Van Deun, Kim, Freddy Haesebrouck, Filip Van Immerseel, Richard Ducatelle, és Frank Pasmans. „Short-Chain Fatty Acids and L-Lactate as Feed Additives to Control *Campylobacter* Jejuni Infections in Broilers”. *Avian Pathology: Journal of the W.V.P.A* 37, sz. 4 (2008): 379–83. <https://doi.org/10.1080/03079450802216603>.

Walter, A., és J. Gutknecht. „Monocarboxylic Acid Permeation through Lipid Bilayer Membranes”. *The Journal of Membrane Biology* 77, sz. 3 (1984): 255–64.
<https://doi.org/10.1007/BF01870573>

Wan, F., F. L. Deng, L. Chen, R. Q. Zhong, M. Y. Wang, B. Yi, L. Liu, H. B. Zhao, és H. F. Zhang. „Long-term chemically protected sodium butyrate supplementation in broilers as an antibiotic alternative to dynamically modulate gut microbiota”. *Poultry Science* 101, sz. 12 (2022. december 1.): 102221. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2022.102221>.

Wang, Hong-Bo, Peng-Yuan Wang, Xin Wang, Yuan-Lian Wan, és Yu-Cun Liu. „Butyrate Enhances Intestinal Epithelial Barrier Function via Up-Regulation of Tight Junction

Protein Claudin-1 Transcription”. *Digestive Diseases and Sciences* 57, sz. 12 (2012): 3126–35.
<https://doi.org/10.1007/s10620-012-2259-4>.

Yan, Hui, és Kolapo M. Ajuwon. „Butyrate Modifies Intestinal Barrier Function in IPEC-J2 Cells through a Selective Upregulation of Tight Junction Proteins and Activation of the Akt Signaling Pathway”. *PloS One* 12, sz. 6 (2017): e0179586.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179586>.

Zhang, W.H., Y. Jiang, Q.F. Zhu, F. Gao, S.F. Dai, J. Chen, és G.H. Zhou. „Sodium butyrate maintains growth performance by regulating the immune response in broiler chickens”. *British Poultry Science* 52, sz. 3 (2011. június 1.): 292–301.
<https://doi.org/10.1080/00071668.2011.578121>.

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék őszinte köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Mackei Máténak és Dr. Mátis Gábornak azért a végtelen támogatásért és türelméért, amik nélkül ez a dolgozat nem jöhetett volna létre. Valamint Dr. Papp-Sebők Csillának az ELISA vizsgálatokban való segítségéért.

Emellett szintén hálával tartozom a családomnak, akikben mindig bízhattam és mindig mellettem álltak.