

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

**Csirkék anyagcserefolyamatainak
takarmányozási faktorokkal történő
szabályozása**

Kulcsárné dr. Petrilla Janka

Témavezető: Dr. Neogrády Zsuzsanna



ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM

Állatorvostudományi Doktori Iskola

Budapest, 2022.

Témavezető:

.....

Dr. Neogrády Zsuzsanna CSc

Élettani és Biokémiai Tanszék, Biokémiai Osztály

Állatorvostudományi Egyetem, Budapest

.....

Kulcsárné dr. Petrilla Janka

Bevezetés

Az értékes és megfizethető hús iránti kereslet világszerte növekszik, ugyanakkor előállításuk során az állatjólétet sem szabad figyelmen kívül hagyni. Éppen ezért az antibiotikumok és hormonok alternatíváiként a rövid szénláncú zsírsavak használata egyre elterjedtebb a sertés- és a baromfitartásban, mivel előbbieik hozamfokozó céllal történő alkalmazása 2006 óta tiltott az Európai Unió területén.

A rövid szénláncú zsírsavak közül a leghatékonyabb és így legszélesebb körben használt n-vajsavat (a továbbiakban: butirát) a monogasztrikus állatok jellemzően takarmánykiegészítőként veszik fel (exogén eredet). A nem védett, szabad butirát sók (leggyakrabban nátrium vagy kalcium sók) gyorsan felszívódnak a gyomor-bélrendszer proximális szakaszaiból, míg a különböző védett formák a távolabbi bélszakaszokat is elérhetik, és így elnyújtott hatásukat a vastagbелеkben is érvényesíthetik. A butirát (és általánosságban a rövid szénláncú zsírsavak) másik lehetséges forrása endogén: ekkor a takarmány oldható nem keményítő típusú poliszacharid (NSP) tartalma szubsztrátként szolgál az anaerob mikrobiális fermentáció számára, mely folyamat madarakban a páros vakbелеkben a legjellemzőbb. Ennélfogva a rövid szénláncú zsírsavak, legfőképpen a butirát termelődése serkenthető NSP-ben gazdag (rozs, árpa vagy búza alapú) takarmány etetésével, szénhidrátbontó enzimekkel történő kiegészítés mellett, a magas NSP tartalmú takarmányok magasabb viszkozitásából eredő hátrányos hatások kiküszöbölése végett.

Dózistól és alkalmazási módtól függően a butirát már a belekben kifejti széleskörű jótékony hatásait: kiegyensúlyozza a mikroflórát, energiaforrásként szolgálva elősegíti a bélhámsejtek differenciációját és proliferációját, befolyásolja az immunválaszt és az inkretintermelést, valamint erősíti a bél barrier funkcióját. A felszívódott butirát ezután a májba jut, ahol energiaforrásként szolgál, vagy kifejtheti glükóztoleranciát javító és méregtelenítő folyamatokat érintő hatásait. Ezt követően a szisztémás keringéssel továbbítva elérheti az extrahepatikus szöveteket, melyekben növelheti a sejtek glükózfelvételét és inzulinérzékenységét. A butirát felsorolt szerepeinek hátterében a molekula disszociációs sajátságai, valamint génexpressziót módosító epigenetikus és receptormediált hatásai említhetők. Annak ellenére, hogy számos tanulmány foglalkozott már a butirát fenti szerepeivel, a madarak anyagcseréjének általános állapotát befolyásoló hatásairól kevés, sokszor ellentmondásokkal terhelt irodalmi adat áll rendelkezésünkre, különösen más takarmányozási faktorokkal történő kombinációi esetén.

Madarakban az emlősökhöz képest számottevően magasabb vércukorszint és csökkent szöveti inzulinérzékenység jellemző. Ezzel összefüggésben madarakban a szénhidrát-anyagcsere legfőbb szabályozója az élettanilag emelkedett vércukorszint fenntartásáért felelős glukagon. Az inzulin jelátviteli út elemeinek válaszkészsége a különböző moduláló faktorokkal szemben idővel jellemzően csökken, míg a glukagon jelátviteli kaszkádelemeké nő. A csirkékre jellemző csökkent inzulinérzékenység növelése kiemelt jelentőséggel bír, mivel fokozott fehérjeszintézishez vezethet a mammalian (vagy mechanistic) target of rapamycin (mTOR)

aktiválásán keresztül, mely kiváltképp a vázizmokban volna kívánatos a növekedési paraméterek esetleges javítása érdekében.

A megfelelő takarmány-összetétel serkentheti az állatok növekedését, továbbá környezetvédelmi és állatjóléti szempontokból is célszerű lehetne. Az aminosavak ipari méretekben történő előállításának lehetősége megteremtette a takarmányok ideális fehérje- és aminosav-összetételének kialakítását, mely a gyakorlatban csökkentett nyersfehérje-tartalmat jelent limitálóaminosav-kiegészítéssel. Ezzel a takarmányozási stratégiával a csirkék aminosav-ellátása megfelelhet a különböző nevelési fázisokban az állatok valós szükségleteinek anélkül, hogy az állományt és a környezetet szükségtelenül terhelnék az emésztetlen és kiürített fehérjékkel vagy fehérje bomlástermékekkel. A takarmányok csökkentett nyersfehérje-tartalma limitáló aminosavakkal történő kiegészítés mellett nem okoz növekedési depressziót, ezért a hagyományos, nyersfehérje alapú takarmányozásnál lényegesen előnyösebb megoldás lehet.

A megfelelő mennyiségű és minőségű hústermelésen kívül a termékek minősége is elengedhetetlen követelmény a brojlerszektorban. Ennek ellenére az Európai Unióban több mint egy évtizede a brojlerhús az élelmiszer eredetű, humán *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) fertőzések fő forrása. A *C. jejuni* szinte minden brojlerállomány gyomor-bélrendszerében megtalálható és általános, egyes esetekben életveszélyes humán zoonózist okoz, amennyiben a vágási folyamat során a karkassz szennyeződik és a végterméket később nem kezelik megfelelően. A megelőzési stratégiák az élő állat *C. jejuni* kolonizációjának mérséklését célozzák, ám a vakcinázás és az antibiotikumhasználat jogi és gyakorlati korlátai más, alternatív megoldásokat, mint az itatóvíz savanyítását és a pro- és prebiotikumok alkalmazását hozták előtérbe. A rövid szénláncú zsírsavak, és kiváltképp a butirát szelektíven gátolja a patogén baktériumok, pl. az *Escherichia coli* és *C. jejuni* törzsek, *Clostridium* és *Salmonella* spp. növekedését, míg az eubiotikus flóra tagjaira kedvező hatással bír.

Célkitűzések

Röviden összefoglalva a PhD kutatásaim fő céljai a következők voltak:

Ad 1, a vérplazma azon biokémiai paramétereinek nyomon követése, amelyek a madár anyagcsere legfontosabb folyamatainak életkorfüggő érzékenységét tükrözik a takarmánygabona típusa (búza vs. kukorica), a nyersfehérje-tartalom (normál vs. 15%-kal csökkentett és limitáló aminosavakkal dúsított) és a nátrium-n-butirát-kiegészítés (1,5 g/kg takarmány vs. kiegészítés nélkül) hatására brojlercsirkében.

Ad 2, annak vizsgálata, hogy a máj inzulin és glukagon jelátviteli útjában szerepet játszó egyes molekulák gén- és fehérjeexpresszióját hogyan befolyásolják a fent részletezett takarmányozási tényezők az intenzív növekedés fázisában.

Ad 3, információt szerezni a karkassz jellemzőinek és a hús kémiai összetételének lehetséges változásairól, amelyeket a különböző típusú butirát (nem-védett, szabad nátrium-n-butirát só vs. különböző védett formák) adagolása, valamint a takarmány nyersfehérje-tartalmának csökkentése (normál vs. 15%-kal csökkentett és limitáló aminosavakkal kiegészített) vált ki kukorica alapú takarmányozás esetén.

Ad 4, a nátrium-n-butirát *Campylobacter jejuni* törzsekkel szemben kifejtett *in vitro* antibakteriális hatásának vizsgálata.

A fenti célok elérése érdekében négy kísérletet terveztünk a táblázatban bemutatott módon.

Kísérlet No	Kísérlet típusa	Állatok kora (napok)	Vizsgált faktor	Vizsgált paraméterek
I. kísérlet	<i>in vivo</i>	7, 21, 42	alapgabona típusa nyersfehérje-tartalom nem védett butirát kiegészítés	Összfehérje, albumin, húgysav, glükóz, triglicerid, GLP-1, GIP és inzulin plazmakoncentrációk AST és CK plazma aktivitások
II. kísérlet	<i>in vivo</i>	21	alapgabona típusa nyersfehérje-tartalom nem védett butirát kiegészítés	májbeli GCGR, IR β és mTOR gén- és fehérjeexpresszió
III. kísérlet	<i>in vivo</i>	42	nyersfehérje-tartalom nem védett butirát kiegészítés védett butirát kiegészítés	Egyes húsrészek és szervek tömege, valamint a comb- és a mellizom kémiai analízise
IV. kísérlet	<i>in vitro</i>	-	nem védett butirát kiegészítés pH <i>C. jejuni</i> törzsek tulajdonságai	a butirát MIC és MBC értékei <i>C. jejuni</i> törzsek antibiotikum rezisztenciája

GLP-1: Glucagon-like peptide 1 (glukagonszerű peptid 1); GIP: Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (glükózfüggő inzulinotróp polipeptid); AST: Aszpartát-aminotranszferáz; CK: Kreatin-kináz; GCGR: Glukagon receptor; IR β : Inzulin receptor β alegység; mTOR: Mammalian target of rapamycin; MIC: Minimum inhibitory concentration (minimum gátló koncentráció); MBC: Minimum bactericidal concentration (minimum baktericid koncentráció).

Anyag és módszer

Az I-III. kísérleteket brojlercsirkékben végeztük *in vivo*, míg a IV. kísérletben számos *Campylobacter jejuni* törzset kezeltünk nátrium-butirát oldattal *in vitro*.

A takarmánygabona, a nyersfehérje és a butirátkiegészítés hatása az anyagcsere-paraméterekre, a kor függvényében (I. kísérlet)

Az **I. kísérlet**ben kétszáznegyven darab hímvárú, napos Ross-308 csibét osztottunk nyolc takarmányozási csoportba ($n = 10/\text{csoport}/\text{mintavételi időpont}$, azaz összesen $n = 30/\text{csoport}$). A kísérletet szigorúan a hatályos nemzeti, nemzetközi jogszabályokkal és útmutatókkal összhangban végeztük, a tartási körülmények megfeleltek a fajtára vonatkozó javaslatoknak, a takarmány és az ivóvíz *ad libitum* az állatok rendelkezésére állt. Az állatkísérlet $2 \times 2 \times 2$ faktoriális elrendezést mutatott: a brojlerek búza vagy kukorica alapú (**WB** vs. **MB** csoportok), az adott nevelési fázis ajánlásainak megfelelő vagy 15%-kal csökkentett nyersfehérje-tartalmú (az indító, nevelő és befejező tápokban 22.7%, 21.4% és 19.1% nyersfehérje-tartalom az **NP** csoportokban, valamint 19.1%, 18.0% és 16.0% nyersfehérje-tartalom az **LP** csoportokban), illetve nátrium-n-butiráttal kiegészített (**But** csoport a gyakorlatban is használt 1,5 g/tak. kg butirátkiegészítéssel) vagy kiegészítés nélküli (**Ctr** csoport) takarmányt kaptak. Tekintettel arra, hogy a búza alapú takarmány NSP-tartalma mintegy tízszerese a kukorica alapúnak, ezen csoportok takarmányát xilanáz és glükánáz NSP-bontó enzimekkel, az LP csoportok takarmányát pedig a négy elsődleges limitáló aminosavval (L-lizin-hidroklorid, DL-metionin, L-treonin és L-triptofán) egészítettük ki.

A feltételezett korfüggés nyomkövetésére a nitrogén- és zsíryanagcsere, valamint az inzulin homeosztázis indikátorait 7, 21 és 42 napos korban mértük. Az egyes mintavételi időpontokban csoportonként tíz, véletlenszerűen kiválasztott csirke szárnyvénájából perifériás vérmintákat vettünk, melyet azonnali centrifugálás, folyékony nitrogénben történő gyorsfagyasztás, majd $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hőmérsékleten tárolás követett a feldolgozásig. Az összfehérje, az albumin, a húgysav, a glükóz és a trigliceridek plazmakoncentrációját, továbbá az aszpartát-aminotranszferáz és a kreatin-kináz enzimaktivitását spektrofotometriával, a glukagonszerű peptid 1 (GLP-1) és glükózfüggő inzulinotróp polipeptid (GIP) inkretinek, valamint az inzulin koncentrációját szendvics ELISA tesztekkel mértük.

A máj inzulin és glukagon jelátvitelének takarmányozási faktorokkal történő befolyásolása az intenzív növekedés időszakában (II. kísérlet)

A **II. kísérlet**ben az I. kísérlet 21 napos állatainak máját használtuk arra, hogy a glukagon receptor, inzulin receptor β és az mTOR takarmányozásfüggő gén- és fehérjeexpressziós mintázatait vizsgáljuk. A mintavétel időpontjának meghatározásában szerepet játszottak az I. kísérlet eredményei és az irodalmi adatok, melyek szerint az intenzív növekedés időszakában

a legnagyobb az anyagcsere válaszkészsége a takarmányozási faktorok módosító hatásaira. Ezen felül kutatási eredmények igazolják, hogy a glukagon jelátviteli elemek az életkorral növekvő, az inzulin jelpálya elemei pedig korral egyre csökkenő válaszkészséget mutatnak, így a 21 napos kor mindkét kaszkádfolyamat tagjainak a vizsgálatára megfelelőnek tekinthető.

A kísérlet 21. napján takarmányozási csoportonként tíz állatot CO₂ gázzal történő bódítás után dekapitáltunk, majd a máj vértelenítését követően mintát vettünk kvantitatív polimeráz láncreakció (q-PCR) és Western blot analízis céljára. A PCR mintákat RNS-izoláló oldatba helyeztük és szárazjégre tettük, míg a Western blot mintákat folyékony nitrogénben gyorsfagyasztottuk, majd minden mintát -80 °C hőmérsékleten tároltunk feldolgozásig.

A PCR-reakciókat az mRNS izolálását és a reverz transzkripciót követően random hexamer primerekkel végeztük. A Western blot analízis során a gélelektroforézist és blottolást követően a célfehérjéket specifikus ellenanyagok alkalmazásával azonosítottuk és kvantifikáltuk.

A takarmány butirátkiegészítésének és nyersfehérje-tartalmának hatásai a karkassz és a húsösszetétel alakulására (III. kísérlet)

A **III. kísérlet**ben hetven darab hímivarú Ross-308 brojlert használtunk. A csibéket napos korukban véletlenszerűen, hét takarmányozási csoportba soroltuk (n = 10/csoport) és az I. kísérletben leírt tartási körülmények között neveltük. Mind a hét csoport takarmányának alapját a kukorica adta (**MB** csoportok). Öt csoport a nevelési fázisnak megfelelő nyersfehérje-tartalmú tápot kapott, míg két csoport takarmányának nyersfehérje-tartalma csökkentett volt, limitáló aminosav kiegészítéssel (**NP** és **LP** csoportok), az I. kísérletnél már ismertetett módon. Ezen felül két csoport egyedei nem védett nátrium-n-butiráttal kiegészített takarmányt (1,5 g/tak. kg, **But** csoport), míg három csoport egyedei védett butirát különböző formáival kiegészített takarmányt kaptak a következőképpen: koncentrált, filmbevonatos nátrium-butirát kiegészítés (90% nátrium-butirát tartalommal 1,0 g/tak. kg mennyiségben, **NP S90** csoport), és növényi zsírba ágyazott nátrium-butirát termékekkel történő kiegészítés különböző butiráttartalommal (40% nátrium-butirát tartalommal 1,5 g/tak. kg mennyiségben, **NP SC40** csoport, illetve 30% nátrium-butirát tartalommal 2 g/tak. kg mennyiségben, **NP SC30** csoport). A dózisokat a gyártó ajánlásának megfelelően határoztuk meg. Kontroll csoportoknak a butirátkiegészítést semmilyen formában nem tartalmazó takarmánnyal etetett csoportokat tekintettük (**Ctrl**).

A 42. napon a csirkéket CO₂ narkózisban dekapitáltuk, majd lemértük a karkassz tömegét (bőrrel és szárnyakkal, zsigerek nélkül), a kicsontozott mellizom és combizom, illetve a máj, a szív, a lép és a hasúri zsír tömegét. Ezen felül 60-60 g mintát vettünk a mellizomból (*m. pectoralis major*) és a combizomból (*m. iliotibialis*), mindig ugyanarról az anatómiai helyről a hús kémiai elemzése céljából. Az izommintákat darabolás és folyékony nitrogénes gyorsfagyasztást követően porítottuk, majd -20 °C hőmérsékleten tároltuk további feldolgozásig.

Az izomminták fehérjetartalmát Kjeldahl módszerrel, lipidtartalmát Soxhlet-készülékkel, éteres extrakció útján határoztuk meg.

A butirát különböző *Campylobacter jejuni* törzsekkel szemben kifejtett antibakteriális hatékonyságának vizsgálata *in vitro* (IV. kísérlet)

A **IV. kísérlet** során az inkubációkat 40 °C fokon végeztünk mikroaerofil körülmények között.

A *C. jejuni* törzseket (hét, telepen gyűjtött és egy referenciatörzs) kíméletesen felengedtetve a -80 °C tárolási hőmérsékletéről, Campylobacter-szelektív agar (CSA) lemezekre szélesztettük, majd 48 órás inkubációt követően egy-egy kiválasztott telepet Campylobacter-szelektív adalékokat tartalmazó Bolton-levesbe oltottunk. A szuszpenziókban lévő *Campylobacter* mennyiséget 48 órás tenyésztést követően határoztuk meg úgy, hogy a telepképző egység (CFU) koncentrációját újabb 48 órás, CSA lemezen végzett inkubáció után határoztuk meg.

Következő lépésként nátrium-butirát különböző töménységű (5; 7,5; 10; 15; 20; 30; 50 és 100 mmol/l) oldataiba $7 \cdot 10^5$ CFU/ml koncentrációjú *C. jejuni* szuszpenziót oltottunk 96 lyukú lemezen. Az oldatok pH értékét tömény sósav hozzáadásával minden esetben pH 6.0 vagy 7.4-re lett állítottuk be, ezzel modellezve a vakbéltartalom két, *in vivo* lehetséges pH értékét, melyek különböző takarmányozási stratégiákkal kialakíthatók. Minden *C. jejuni* törzset vizsgáltunk a nyolc felsorolt butirát koncentráción és mindkét pH értéken.

A *C. jejuni* törzseket a különböző butirát-tartalmú oldatokban 48 órán keresztül inkubáltuk, majd a CFU/ml értékeket CSA lemezekre történő kioltással határoztuk meg, hígítási sor segítségével. A telepeket 48 órás tenyésztés után megszámloltuk; majd a telepszámok alapján meghatároztuk a butirát minimum gátló (MIC) és minimum baktericid koncentrációit (MBC).

A vizsgált törzsek antibiotikum-érzékenységét enrofloxacin (5 µg/lkorong) és ampicillin (10 µg/korong) kezeléssel is vizsgáltuk CSA lemezeken hagyományos korongdiffúziós módszerrel. Az adott törzset rezisztensként bíráltuk el az antibiotikummal szemben, amennyiben 5 mm-nél kisebb gátlási zóna alakult ki.

Statisztika

Az **I. és III. kísérletben** a főhatásokat (WB vs. MB, LP vs. NP és butirátkiegészítésben részesült vs. butirátkezelésben nem részesült csoportok) többutas varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltuk, míg a csoportonkénti összehasonlítást post-hoc Tukey teszttel végeztük. Az I. kísérletben az egyes mintavételi időpontok eredményeit külön vizsgáltuk. A korfüggő hatások elbírálásához a kukorica alapú, normál nyersfehérje-tartalmú és butiráttal ki nem egészített takarmányon nevelt csoportok eredményeit használtuk, Mann-Whitney teszttel.

A **II. kísérletben** a főhatásokat és az interakciókat többutas ANOVA analízissel teszteltük, a becsült marginális átlagok csoportonkénti összehasonlásait az R program *emmeans* funkciójával végeztük, majd a P értékeket és a megbízhatósági szinteket Tukey tesztekkel állítottuk be.

A **IV. kísérletben** leíró statisztikát alkalmaztunk a korlátozott mintaelemszám miatt.

A kísérletek eredményeit szignifikánsnak fogadtuk el $P < 0,05$ érték esetében.

Eredmények és megbeszélés

A takarmánygabona, a nyersfehérje és a butirátkiegészítés hatása az anyagcsere-paraméterekre, a kor függvényében (I. kísérlet)

Az **I. kísérlet**ben az anyagcsere válaszkészségének figyelemreméltó korfüggését tapasztaltuk a vizsgált takarmányozási faktorok vonatkozásában. A szignifikáns eredmények többségét az intenzív növekedés szakaszában kaptuk (21 napos kor). Ezen felül a takarmánygabona típusa elsősorban az aminosav- és nitrogén-anyagcserével összefüggő paraméterekre fejtette ki a hatását, feltehetőleg a búza magas NSP tartalma által serkentett, megnövekedett endogén butiráttermelés révén. A takarmányozási faktorok számos szignifikáns hatása ellenére a mért eredmények egy kivétellel mind az élettani tartományba estek, emellett a csökkentett nyersfehérje-tartalmú takarmányok nem okoztak növekedési depressziót. Az izomsejtekből felszabaduló kreatin-kináz enzimaktivitás a plazmában meghaladta az élettani szintet az állatok 42 napos korára, ugyanakkor a boncolás során nem tapasztaltuk izomkárosodás jeleit. Érdekes módon a plazma glükózkoncentrációja csökkent 21 napos korban a plazma inzulin vagy inkretin szintjének szignifikáns változása nélkül. Az idő előrehaladtával a plazma húgysavkoncentrációja csökkent, míg a plazma kreatin-kináz aktivitása, GLP-1 és inzulin koncentrációja növekedett, függetlenül a takarmányozási csoportoktól.

A máj inzulin és glukagon jelátvitelének takarmányozási faktorokkal történő befolyásolása, az intenzív növekedés időszakában (II. kísérlet)

A glukagon receptor génexpressziója nőtt a WB és az LP csoportokban, ugyanakkor ez nem eredményezte a fehérjeexpresszió növekedését. Ezzel szemben a butirátkiegészítés csökkentette ugyanezen paraméter fehérjeexpresszióját a génexpresszió megváltoztatása nélkül, mely a háttérben lehetséges poszttranszlációs módosításokra enged következtetni. Az IR β esetében a búza alapú takarmányozás emelte, a butirátkiegészítés pedig mérsékelte a fehérje kifejeződését, számos interakcióval mind gén, mind fehérjeexpressziós szinten. A jelenség rávilágít arra, hogy különböző forrásokból származó butirát különböző, akár ellentétes biológiai hatást fejthet ki. Az mTOR génexpressziója nőtt a WB és LP csoportokban, ugyanakkor ez a növekedés fehérje szinten már csak a WB csoportokban volt tapasztalható. Figyelembe véve, hogy a búza alapú takarmányozás az inzulin jelpálya mindkét vizsgált eleménél növelte a fehérje mennyiségét, ez az alapgabona alkalmas lehet a máj inzulinérzékenységének növelésére az intenzív növekedés időszakában. Ezt az elképzelést megerősíti az I. kísérletben változatlan inzulin és GLP-1 szintek mellett mért alacsonyabb plazma glükózkoncentráció. Mindazonáltal a tapasztalt interakciók felhívják a figyelmet arra,

hogy a kívánt jótékony hatások elérése érdekében a takarmány igen körültekintő összeállítása szükséges.

A takarmány butirátkiegészítésének és nyersfehérje-tartalmának hatásai a karkassz és a húsösszetétel alakulására (III. kísérlet)

Minden vizsgált védett butirát típus és a csökkentett nyersfehérje-tartalmú takarmány is növelte a karkassz tömegét a vágási korra, de a nem védett butirát – a védett butiráttal kiegészített és LP takarmányozással együtt – csak a mellizom relatív tömegét növelte, feltehetőleg a bélrendszerben kifejtett összetett hatásai és szisztémás inzulinérzékenységet növelő befolyása révén, mely fokozott izomfehérje szintézishez vezethetett. Az LP csoportokban tapasztalt, előnyös hatás a kontroll csoportokhoz képest a nagyobb aminosav:fehérje aránynak lehet köszönhető, mely a limitáló aminosav kiegészítés következménye. A mellizom kémiai összetétele ugyanakkor változatlan maradt, mely e húsrész nagyfokú stabilitására utal. Ezzel szemben minden vizsgált takarmányozási faktor növelte a combizom lipidtartalmát a fehérjetartalom rovására az izomtömeg és a hasúri zsírdépők mennyiségének szignifikáns megváltoztatása nélkül. A védett butirátformák a nem védetthez képest a karkassz tömegét és a relatív mellizom szintézist sikeresebben emelték, mely a kétféle takarmánykiegészítő különböző felszívódási sajátságaival magyarázható.

A butirát különböző *Campylobacter jejuni* törzsekkel szemben kifejtett antibakteriális hatékonyságának vizsgálata *in vitro* (IV. kísérlet)

A butirát antimikrobiális hatását pH 6,0 értéken már sokkal kisebb koncentrációban kifejtette (a pH = 7,4 értéken mérthez képest). Ez a várakozásnak megfelelt, mivel alacsonyabb pH értéken a disszociálatlan vajsav forma előfordulása a jellemző, mely a patogén baktériumokkal szemben ki tudja fejteni hatását. Hét törzs esetében a MIC – mely ebben az esetben megegyezett az MBC értékkel – 100 mmol/l koncentrációnak adódott pH = 7,4 értéken, míg a MIC 5 mmol/l és az MBC, törzstől függően 5-7,5 mmol/l volt pH = 6,0 értéken. Eredményeink azt valószínűsítik, hogy 90%-os biztonsággal bármely *C. jejuni* törzs szaporodása meggátolható 8 mmol/l koncentrációjú butirátkezeléssel pH = 6,0 értéken.

Egyetlen *C. jejuni* törzs mutatott kiemelkedő ellenállóképességet a butiráttal szemben: ebben az esetben pH 7,4 értéken még a legmagasabb butirátkoncentráció sem volt képes meggátolni a szaporodást, és 30 mmol/l butirátkoncentráció felelt meg a MIC és az MBC feltételeinek pH = 6,0 értéken. Hasonlóan, ez a törzs rezisztensnek bizonyult az ampicillinnel szemben, míg minden más törzs érzékeny volt ampicillinre és minden vizsgált törzs érzékeny volt enrofloxacin kezelésre.

Tekintettel arra, hogy 6,0 körüli pH és a számolt MIC (és MBC) butirátkoncentrációk megfelelő takarmányösszetétellel (pl. magas NSP-tartalmú takarmányok etetésével)

kialakíthatók egyes bélszakaszokban, a butirát hatékony eszköz lehet brojlerek *C. jejuni* kolonizációjának mérséklésében.

Következtetések

Az eredmények alapján az alkalmazott gabonák, nyersfehérje-koncentrációk és a takarmány nem védett butiráttal történő kiegészítése biztonsággal alkalmazhatónak tűnik, mivel a vizsgált vérplazma-paraméterek értékei a vizsgált takarmányozási faktorok hatására az élettani tartományban változtak.

A brojlerek szervezetének válaszkészsége az intenzív növekedés szakaszában volt a legjelentősebb, ekkor a búza alapú takarmányozás növelte a hepatikus inzulin jelátviteli út vizsgált fehérjéinek mennyiségét, ami a máj fokozódott inzulinérzékenységére utalhat. Ez pozitívan befolyásolhatja az izomfehérjék szintézisét és ezáltal a termelési paraméterek alakulását.

A csökkentett nyersfehérje-tartalom limitálóaminosav-kiegészítéssel csakúgy, mint a butirát nem védett és vizsgált védett formái növelték a mellizom relatív tömegét az izomösszetétel megváltoztatása nélkül és a combizom minőségének javulását idézték elő, de nem befolyásolták annak tömegét. Ezért a felsorolt takarmányozási faktorok alkalmasak lehetnek a karkassz egyes jellemzőinek megváltoztatására.

Végül, a legtöbb *C. jejuni* törzssel szemben a baktériumok szaporodásának gátlására *in vitro* körülmények között hatékonynak talált pH érték és butirát koncentráció megfelelő takarmányozással kialakíthatók, ezért – nem felejtve a lehetséges, *in vivo* körülmények között fellépő kölcsönhatásokat sem – a butirát megfelelő lehet a *C. jejuni* kolonizáció kontrollálására új megelőzési stratégiák részeként.

Új tudományos eredmények

Ad 1,

A takarmánygabona típusa és a nyersfehérje-tartalom szignifikánsan befolyásolták a brojlercsirkék legfőbb vérparamétereit, mely 21 napos korban volt a legkifejezettebb. Ugyanakkor minden takarmányozással összefüggő változás az élettani tartományba esett.

Ad 2,

Az intenzív növekedés szakaszában (21 napos korban) a búza alapú takarmányozás – a kukorica alapúhoz képest – növelte az IR β és az mTOR inzulin jelátviteli fehérjék mennyiségét a brojlerek májában, így potenciálisan fokozhatja a máj inzulinérzékenységét. A nem védett nátrium-n-butirát takarmánykiegészítőként csökkentheti mind a máj glukagon receptor, mind az IR β fehérje expresszióját.

Ad 3,

A brojlercsirkék mellhúsának szintézisét hatékonyan lehetett serkenteni a 15%-kal csökkentett nyersfehérje-tartalmú, limitáló aminosavakkal kiegészített takarmánnyal és védett vagy nem védett n-butirát alkalmazásával, ugyanakkor a mellizom kémiai összetétele változatlan maradt. Ezzel szemben ugyanezen takarmányozási faktorok megváltoztatták a combizom összetételét anélkül, hogy annak relatív tömegét befolyásolták volna, azonban a karkassz tömegét szignifikánsan növelték.

Ad 4,

A nátrium-n-butirát a legtöbb *C. jejuni* törzssel szemben *in vitro* antibakteriális hatást fejtett ki pH = 6,0 értéken 5 mmol/ml (MIC) és 5-7,5 mmol/l (MBC) koncentrációban, mely koncentrációk megfelelő takarmány összeállítással kialakulhatnak a brojlerek bélrendszerében.

Saját tudományos közlemények

Az értekezés témájában megjelent tudományos közlemények

Petrilla, J.; Mátis, G.; Mackei, M.; Kulcsár, A.; Sebők, Cs.; Papp, M.; Gálfi, P.; Fébel, H.; Huber, K.; Neogrády, Zs.: **Modulation of Hepatic Insulin and Glucagon Signaling by Nutritional Factors in Broiler Chicken.** *Veterinary Sciences*, 9. 103, 2022.

Petrilla, J.; Mátis, G.; Molnár, A.; Jerzsele, Á.; Pál, L.; Gálfi, P.; Neogrády, Zs.; Duplecz, K.: **A butirát antibakteriális hatékonyságának *in vitro* vizsgálata különféle *Campylobacter jejuni* törzseken (Investigation of *in vitro* antibacterial efficacy of the short chain fatty acid butyrate on various *Campylobacter jejuni* strains).** *Magyar Állatorvosok Lapja*, 143. 57–64, 2021.

Mátis, G.; Petrilla, J.; Kulcsár, A.; Van den Bighelaar, H.; Boomsma, B.; Neogrády, Zs.; Fébel, H.: **Effects of dietary butyrate supplementation and crude protein level on carcass traits and meat composition of broiler chickens.** *Archives Animal Breeding*, 62. 527–536, 2019.

Petrilla, J.; Mátis, G.; Kulcsár, A.; Talapka, P.; Bíró, E.; Mackei, M.; Fébel, H.; Neogrády, Zs.: **Effect of dietary cereal type, crude protein and butyrate supplementation on metabolic parameters of broilers.** *Acta Veterinaria Hungarica*, 66. 408–452, 2018.

Nemzetközi konferencián történő részvétel (előadás vagy poszter prezentáció formájában)

Petrilla, J.; Mátis, G.; Kulcsár, A.; Talapka, P.; Bíró, E.; Mackei, M.; Fébel, H.; Neogrády, Zs.: **The effect of dietary cereal type, crude protein content and butyrate application on selected markers of metabolism in broiler chickens.** GfE (Society of Nutrition Physiology) Conference, Göttingen, Germany, 2017.

Hazai konferencián történő részvétel

Kulcsár, A.; Sebők, Cs.; Mátis, G.; Talapka, P.; Hatala, P.; Petrilla, J.; Fébel, H.; Neogrády, Zs.: **Az inzulin és a glukagon jelpálya különböző takarmányozási faktorok segítségével történő szabályozása brojlercsirkében.** MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, Hungary, 2018.

Kulcsárné Petrilla, J.; Mátis, G.; Kulcsár, A.; Talapka, P.; Bíró, E.; Mackei, M.; Fébel, H.; Neogrády, Zs.: **Metabolikus paraméterek változásai a takarmánygabona típusa, a takarmány nyersfehérje-tartalma és butirátkiegészítés hatására csirkében.** MTA Akadémiai Beszámoló, Budapest, Hungary, 2017.

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Kulcsárné Petrilla, J.; Talapka, P.; Bardóczy, M.; Mackei, M.; Neogrády, Zs.; Fébel, H.: **Egyes takarmányozási tényezők brojlercsirkék testösszetételére**

gyakorolt hatásának vizsgálata. MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2017.

Kulcsár, A.; Molnár, A.; Mátis, G.; Petrilla, J.; Pál, L.; Jerzsele, Á.; Neogrády, Zs.; Duplecz, K.: **A különböző koncentrációban adott butirát gtló hatásának *in vitro* vizsgálata *Campylobacter jejuni* törzsekre.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2013.

Az értekezés témájához szorosan nem kapcsolódó tudományos közlemények

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Mackei, M.; Petrilla, J.; Neogrády, Zs.: **Comparative study on the modulation of insulin and incretin homeostasis by butyrate in chicken and rabbit.** *PLoS ONE*, 13. e0205512, 2018.

Kulcsár, A.; Mátis, G.; Molnár, A.; Petrilla, J.; Wágner, L.; Fébel, H.; Husvéth, F.; Duplecz, K.; Neogrády, Zs.: **Nutritional modulation of intestinal drug-metabolizing cytochrome P450 by butyrate of different origin in chicken.** *Research in Veterinary Science*, 113. 25–32, 2017.

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Talapka, P.; Neogrády, Zs.: **Porcine hepatocyte-Kupffer cell co-culture as an in vitro model for testing the efficacy of anti-inflammatory substances.** *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101. 201–207, 2017.

Kulcsár, A.; Mátis, G.; Kulcsárné Petrilla, J., Neogrády, Zs.: **A bélnyálkahártya szerepe a xenobiotikumok metabolizmusában, különös tekintettel a citokróm P450 enzimrendszerre. Irodalmi áttekintés (The role of intestinal mucosa in the metabolism of xenobiotics with particular regard to the cytochrome P450 enzyme system. Literature review).** *Magyar Állatorvosok Lapja*, 138. 243–250, 2016.

Kulcsár, A.; Mátis, G.; Molnár, A.; Petrilla, J.; Husvéth, F.; Huber, K.; Duplecz, K.; Neogrády, Zs.: **Effects of butyrate on the insulin homeostasis of chickens kept on maize- or wheat-based diets.** *Acta Veterinaria Hungarica*, 64. 482–496, 2016.

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Hermándy-Berencz, K.; Neogrády, Zs.: **Feed-drug interaction of orally applied butyrate and phenobarbital on hepatic cytochrome P450 activity in chickens.** *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 100. 637–642, 2016.

Mátis, G.; Hatala, P.; Kulcsár, A.; Kulcsárné Petrilla, J.; Neogrády, Zs.: **A Kupffer-sejtek szerepe a máj gyulladáshoz és metabolikus folyamatainak szabályozásában. Irodalmi áttekintés (Role of Kupffer-cells in the regulation of hepatic inflammatory and metabolic processes. Literature review).** *Magyar Állatorvosok Lapja*, 137. 569–575, 2015.

Farkas, O.; Mátis, G.; Pásztí-Gere, E.; Palócz, O.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Csikó, Gy.; Neogrády, Zs.; Gálfi, P.: **Effects of Lactobacillus plantarum 2142 and sodium n-butyrate in LPS-triggered inflammation: comparison of IPEC-J2 and primary hepatocyte monocultures with a porcine enterohepatic co-culture system.** *Journal of Animal Science*, 92. 3835–3845, 2014.

Mátis, G.; Lengyel, P.; Kulcsár, A.; Kulcsárné Petrilla, J.; Neogrády, Zs.: **A szénhidrát-anyagcsere és az inzulin-homeosztázis sajátosságai csirkében. Irodalmi összefoglaló (Special characteristics of carbohydrate metabolism and insulin homeostasis in chicken. Literature review).** *Magyar Állatorvosok Lapja*, 136. 342–349, 2014.

Mátis, G.; Csikó, Gy.; Jemnitz, K.; Veres, Zs.; Fébel, H.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Neogrády, Zs.: **A takarmányba kevert butirát citokróm P450 enzimekre gyakorolt hatásának vizsgálata patkány májban (Investigation of the effect of butyrate supplementation of the diet on hepatic cytochrome P450 enzymes in rats).** *Magyar Állatorvosok Lapja*, 135. 109–116, 2013.

Nemzetközi konferencián történő részvétel (előadás vagy poszter prezentáció formájában)

Mackei, M.; Kulcsárné Petrilla, J.; Orbán, K.; Neogrády, Zs.; Mátis, G.; Fébel, H.: **Modulation of plasma incretin and insulin levels by oral butyrate application in chicken and rabbit.** 23rd Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition, Turin, Italy, 2019.

Kulcsár, A.; Mátis, G.; Petrilla, J.; Talapka, P.; Fébel, H.; Neogrády, Zs.; Huber, K.: **Influencing insulin homeostasis of broiler chicken by maize- or wheat-based diets.** XXth World Veterinary Poultry Association Congress, Edinburgh, Scotland, 2017.

Kulcsár, A.; Mátis, G.; Petrilla, J.; Talapka, P.; Neogrády, Zs.; Huber, K.: **Effect of maize- or wheat-based diets on the abundance of selected proteins involved in insulin signaling of broiler chicken.** GfE (Society of Nutrition Physiology) Conference, Göttingen, Germany, 2017.

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Talapka, P.; Bardóczy, M.; Mackei, M.; Neogrády, Zs.; Fébel, J.: **Investigations on the effects of certain nutritional factors on carcass composition of broiler chickens.** GfE (Society of Nutrition Physiology) Conference, Göttingen, Germany, 2017.

Kulcsár, A.; Mátis, G.; Petrilla, J.; Mackei, M.; Neogrády, Zs.: **Comparative examinations on the nutritional modulation of incretin and insulin secretion in chicken and rabbit.** DVG Conference, Berlin, Germany, 2016.

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Molnár, A.; Petrilla, J.; Wágner, L.; Dublec, K.; Neogrády, Zs.: **Butyrate of different origin affects intestinal drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in chicken.** XXV World's Poultry Science Congress, Peking, China, 2016.

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Orbán, K.; Neogrády, Zs.: **Porcine hepatocyte – Kupffer-cell co-cultures as in vitro models for testing the efficacy of anti-inflammatory molecules.** DVG Conference, Physiology and Biochemistry, Berlin, Germany, 2016.

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Neogrády, Zs.: **Nutritional modulation of insulin and incretin homeostasis by butyrate in broiler chickens.** GfE (Society of Nutrition Physiology) Conference, Göttingen, Germany, 2015.

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Neogrády, Zs.: **Establishment of a porcine hepatocyte – Kupffer cell co-culture as a novel inflammatory model in veterinary research.** XVIIIth International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid, Asilomar, United States of America, 2015.

Hermándy-Berencz, K.; Mátis, G.; Petrilla, J.; Kulcsár, A.; Huber, K.; Neogrády, Zs.: **How can butyrate modify the induced cytochrome P450 enzyme activity in the liver of chicken?** GfE (Society of Nutrition Physiology) Conference, Göttingen, Germany, 2014.

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Kenéz, Á.; Csikó, Gy.; Neogrády, Zs.; Huber, K.: **Epigenetic consequences of oral butyrate application in chicken.** GfE (Society of Nutrition Physiology) Conference, Göttingen, Germany, 2013.

Mátis, G.; Pászti-Gere, E.; Farkas, O.; Kulcsár, A.; Palócz, O.; Petrilla, J.; Csikó, Gy.; Neogrády, Zs.; Gálfi, P.: **Effects of LPS challenge and the role of probiotics in IPEC-J2 cell monoculture and a novel porcine enterohepatic co-culture system.** International Scientific Conference on Probiotics and Prebiotics, Košice, Slovakia, 2013.

Hazai konferencián történő részvétel

Kulcsár, A.; Mátis, G.; Kulcsárné Petrilla, J.; Talapka, P.; Neogrády, Zs.; Huber, K.: **A kukorica és búza alapú takarmány hatása az inzulin-homeosztázisra brojlercsirkében.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2017.

Mátis, G.; Kulcsár, A.; Kulcsárné Petrilla, J.; Talapka, P.; Hatala, P.; Mackei, M.; Neogrády, Zs.: **A hőstressz sejtszintű hatásainak vizsgálata csirke májsejt – Kupffer-sejt kultúráján.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2017.

Kulcsár, A.; Mátis, G.; Petrilla, J.; Mackei, M.; Neogrády, Zs.: **Az inkretin és inzulin szekréció eltérő alakulása csirkében és nyúlban: összehasonlító vizsgálatok.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2016.

- Mátis, G.; Kulcsár, A.; Kulcsárné Petrilla, J.; Orbán, K.; Neogrády, Zs.: **Terpinen-4-ol és nátrium n-butirát gyulladáscsökkentő hatásának vizsgálata májsejt – Kupffer-sejt ko-kultúrákon.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2016.
- Kulcsár, A.; Mátis, G.; Molnár, A.; Kulcsárné Petrilla, J.; Farkas, O.; Wágner, L.; Fébel, H.; Neogrády, Zs.: **Enterális CYP enzimek aktivitásának változása a (n-)butirát különböző alkalmazási formáinak hatására csirkében.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2015.
- Mátis, G.; Kulcsár, A.; Kulcsárné Petrilla, J.; Hatala, P.; Kővágó, Cs.; Neogrády, Zs.: **Bakteriális lipopoliszacharidok által kiváltott gyulladás vizsgálata sertés hepatocytá – Kupffer-sejt ko-kultúra modellen.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2015.
- Mátis, G.; Kulcsár, A.; Kulcsárné Petrilla, J.; Lengyel, P.; Mackei, M.; Neogrády, Zs.: **Az inzulin- és az inkretin-homeosztázis befolyásolása nutritív faktorokkal csirkében.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2015.
- Mátis, G.; Kulcsár, A.; Kulcsárné Petrilla, J.; Hatala, P.; Kővágó, Cs.; Csikó, Gy.; **Neogrády, Zs.: A Kupffer-sejtek arányának meghatározása sertés primer májsejttenyészetben.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2014.
- Mátis, G.; Kulcsárné Petrilla, J.; Kulcsár, A.; Hermándy-Berencz, K.; Csikó, Gy.; Neogrády, Zs.: **Befolyásolja-e a butirát az indukált citokróm P450 aktivitást a csirke májában?** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2014.
- Palócz, O.; Farkas, O.; Csikó, Gy.; Pásztiné Gere, E.; Mátis, G.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Neogrády, Zs.; Gálfi, P.: **Probiotikumok hatása LPS kiváltotta gyulladás mellett in vitro bélhám – májsejt kokultúra modellen.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2014.
- Farkas, O.; Palócz, O.; Csikó, Gy.; Pásztiné Gere, E.; Mátis, G.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Neogrády, Zs.; Gálfi, P.: **Oxidatív stressz és gyulladás hatásának vizsgálata in vitro bélhám- és májsejt ko-kultúra modellen.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2013.
- Mátis, G.; Csikó, Gy.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Farkas, O.; Palócz, O.; Neogrády, Zs.; Gálfi, P.: **Bakteriális lipopoliszacharidok által kiváltott oxidatív stressz hatása sertés primer májsejttenyészetben.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2013.
- Mátis, G.; Csikó, Gy.; Kulcsár, A.; Petrilla, J.; Pleva, D.; Neogrády, Zs.; Gálfi, P.: **Máj citokróm P450 enzimek aktivitásának vizsgálata bolusban adott butirátkezelést követően brojlercsirkében.** MTA Akadémiai Beszámolók, Budapest, Hungary, 2013.

Diplomamunka témavezetés

Bíró Enikő: **Metabolikus paraméterek változásai a takarmánygabona típusa, a takarmány nyersfehérje-tartalma és butirátkiegészítés hatására csirkében.** TDK dolgozat, 2016.

Témavezetők: Kulcsárné dr. Petrilla Janka, Neogrády Zsuzsanna

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt szeretném kifejezni őszinte hálámat a témavezetőmnek, **Neogrády Zsuzsannának** fáradhatatlan szakmai és emberi támogatásáért, és hogy mindig fordulhattam hozzá kérdéseimmel nem csak nappal, de akár késő este is. Szintén hálás köszönettel tartozom **Mátis Gábor** barátomnak és kollégámnak, aki bátorított és mindig kész volt minden elképzelhető segítséget megadni. Különösen hálás vagyok **Fébel Hedvignek**, aki a csapat jobb keze volt az állattakarmányozási kísérlet koncepciójának kidolgozásában, valamint az *in vivo* vizsgálatok és a karkassz elemzések házigazdája Herceghalomban.

Külön köszönet illeti **Prof. Korinna Hubert** a kedves támogatásáért és azért a lehetőségért, hogy hetekig Stuttgartban végezhattük a laboratóriumi munkát. Szeretném köszönetemet kifejezni **Claudia Hessnek**, amiért biztosította a *Campylobacter jejuni* törzseket az *in vitro* kísérlethez, és hogy lehetőséget biztosított a laboratóriumi munkára az antibiotikum-rezisztencia mérésekhez.

Nagyon hálás vagyok tanáromnak, **Veresegyházy Tamásnak**, aki minden elképzelhető módon támogatta első lépéseimet a biokémia területén. Külön köszönet illeti **Prof. Kutas Ferencet**. Köszönettel tartozom törődéséért, bölcs tanácsaiért és türelméért. Hálás vagyok továbbá **Prof. Gálfi Péternek** és **Jerzsele Ákosnak** a Gyógyszertani és Méregtani Tanszékről, hogy az *in vitro* kísérlethez megfelelő laboratóriumi körülményeket biztosítottak, valamint hasznos tanácsaikat és támogatásukat. Hadd fejezzem ki köszönetemet **Kulcsár Annának**, aki gyermekkorom óta része - magán, később tudományos - életemnek, a Western blot mérésekben végzett áldozatos munkájáért és azért, hogy bevezetett a statisztika alapjaiba.

Örömmel ismerem el és köszönöm az élettani és biokémiai tanszéken dolgozó kollégáim megbízható munkáját és jelenlétét. Köszönöm **Talapka Petrának** a tanulmányok előkészítésében és a tanszéki mindennapi munka során nyújtott segítségét, valamint **Lajtai Antalné Erika**, **Tolnainé Hinka Márta**, **Kinálné Szikora Zsuzsanna** precíz és értékes laboratóriumi háttérmunkáját, valamint **Seprődi Júlia** mindennapos, és nélkülözhetetlen munkáját. Külön köszönet illeti **Papp Márton** a statisztikai kiértékelésekben való kiváló közreműködéséért, valamint **Papp-Sebők Csillát** szíves támogatásáért és toleranciájáért. Köszönet **Mackei Máténak** a mindig nyugodt és segítőkész hozzáállásáért, őszinte barátságáért és a mintavételi eljárásokban és mérésekben végzett munkájáért. Hálás vagyok továbbá **Mátis Ferencnek** a számos ábra szerkesztésében és formázásában nyújtott szakszerű segítségéért.

Hálás vagyok **Margaret Oakley**-nak és **Peter Hutchinson**-nak, hogy vállalták a dolgozat átolvasásának terhét.

Köszönetemet szeretném kifejezni **Kenéz Ákosnak**, nemcsak a mintavételezésért, hanem bátorító kedvességéért is, amikor csak lehetőségünk nyílt beszélgetni.

Külön köszönetet szeretnék mondani **Bíró Enikő** végzett hallgatónak, hogy a laboratóriumi kurzusok során kialakult nagyon jó kapcsolat után társtémavezetőségem mellett írta meg TDK dolgozatát. Köszönöm, hogy hozzájárult a munkám sikeréhez.

Ezen kívül külön köszönettel tartozom **családomnak és barátaimnak**, akik minden tőlük telhetőt megtettek annak érdekében, hogy segítsenek a doktori munkám elkezdésében és végül befejezésében. Végül, de nem utolsósorban, szeretném kifejezni őszinte hálámat és köszönetemet **férjemnek, Mártonnak és fiunknak, Zsombornak**. Az ő elnéző és feltétel nélküli szeretetük nélkül esélyem sem lett volna befejezni ezt a hatalmas munkát. "A szeretet azt jelenti, hogy felkutatjuk és betöltjük a másik valódi igényeit."