

**SZENT ISTVÁN EGYETEM, MEZŐGAZDASÁG- ÉS
KÖRNYEZETTUDOMÁNYI KAR TAKARMÁNYOZÁSTANI TANSZÉK
GÖDÖLLŐ**

ZÁRÓJELENTÉS

A T 046751 SZÁMÚ TEMATIKUS OTKA PÁLYÁZAT KERETÉBEN

2004-2006. ÉVBEN

VÉGZETT TEVÉKENYSÉGRŐL

Egyes környezeti terhelések (kadmium, króm, nikkkel) hatásának vizsgálata baromfi embrió modellben különös tekintettel a lipidperoxidációra és a glutation redox rendszer működésére

Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár
témavezető

GÖDÖLLŐ

2007. FEBRUÁR 22.

Vizsgálataink célja annak megállapítása volt, egyes a gyakorlatban is előforduló környezeti fémek által előidézett terhelés hatását felmérjük a lipidperoxidációs és a glutation redox rend-szer, mint a biológiai antioxidáns védőrendszer egyik lényeges eleme, vizsgálatán keresztül baromfi embrió modellben. A vizsgált fémterhelések, általunk is felmért morfológiai hatásai ezen a modellen már korábban feltárássra kerültek, így általános toxikológiai szempontból a hatások már ismertek, azok hatása a baromfi embrió, illetve a kikelt baromfi májának lipidperoxid és antioxidáns státuszára azonban nem. A baromfi embrió kísérleti szempontból zárt rend-szernek tekinthető, így a későbbiekben ismertetésre kerülő vizsgálatok során megállapított változások feltevésünk szerint csak az általunk alkalmazott kezelésekkel magyarázhatók.

Nehézfém-terhelés hatásainak felmérése során a tojásokat az inkubáció előtt alkalmazott egyszeri fűrésztéses, illetve a későbbiekben a légkamrába történő injektálásos technikával kezeltük a kérdéses fémek (kadmium, króm, ólom) vízoldható sóinak szubletális dózisaival. Az egyes kezeléseknél a nehézfém koncentrációk meghatározásánál az MSZ 12749 szabványban megadott, a felszíni vizek minőségére vonatkozó és a IV. szennyezettségi kategóriához tartozó határértékeket vettük figyelembe. Ennek megfelelően az egyes fémek fűrésztéses és injektálásos kezelése esetén alkalmazni kívánt dózisokat az alábbiakban adjuk meg:

Vizsgált nehézfém	Fűrésztő oldat nehézfém-koncentrációja (mg/l)	Injektált nehézfém koncentrációja (ng/g tojás)
Kadmium (Cd 1) (Cd 2) (Cd 3)	5	0,01
	500	1
	5000	10
Króm (Cr 1) (Cr 2) (Cr 3)	50	0,1
	5000	10
	50000	100
Nikkel (Ni 1) (Ni 2) (Ni 3)	200	0,4
	20000	40
	200000	400

Vizsgálataink során házityúk (Hubbard illetve Ross 308 brojler csirke) tenyésztőtojásokat inkubáltunk. A keltetés az EGGSTAR 600-as keltetőben történik. Az előkeltetés alatt 37,8 °C léghőmérsékletet és 50-55% relatív páratartalmat biztosítunk, és a tojásokat a gép 2 óránként forgatja. A bujtatás idejére a páratartalmat 75%-ra emeljük.

A fémtartalom meghatározása a fűrésztő folyadék, a tojások, az embriók, a kikelt csibék és a kifejlett csirkék máj mintáiból savas roncsolást követően, indukált csatolású plazma emissziós spektrometriás (ICP) módszerrel történt. (A méréseket a Bálint Analitika Kft., Budapest végezte).

A májminták lipidperoxid és antioxidáns státuszát az alábbi **biokémiai módszerekkel** határoztuk meg. A lipidperoxid státusz változását a **malondialdehid** tartalom változásával követtük nyomon, amelyet a májminták 1:9 homogenizátumban mértünk 2-tiobarbitursavas reakcióval, amelyhez standardként 1,1,3,3,-tetraetoxi-propánból savas hidrolízissel készített malondialdehid szolgál.

A glutation redox rendszer változását részben a **redukált glutation** tartalom mennyiségének mérésével határoztuk meg, amelyet a májhomogenizátum 10.000 g szupernatans frakciójában 5,5'-ditiobis (2-nitrobenzoesav) reakcióval spektrofotometriásan mértünk. Mértük emellett a **glutation-peroxidáz** (E.C. 1.11.1.9) aktivitását végpontos direkt assay segítségével kumul-hidroperoxid és redukált glutation kosubsztrátok jelenlétében spektrofotometriás módszerrel. Az enzimaktivitás értékét a minták fehérjetartalmára vonatkoztatva adjuk meg. Az szövetminták 1:9 homogenizátumának 10.000 g szupernatans frakciójának fehérje tartalmát Folin-fenol reagenssel határoztuk meg szarvasmarha szérumban albumin standard segítségével.

Az *aszorbinsav* tartalom meghatározását a minták azonnal elvégzett savanyítását (10 % triklórecet-sav) követően 2,4-dinitrofenil hidrazin színreagens segítségével spektrofotometriás úton határozzuk meg.

A kontroll és az egyes fémterhelésnek alávetett csoportok között a különbségeket *matematikai statisztikai szempontból* a morfológiai eltérések esetében Fisher teszttel, míg a biokémiai paraméterek átlagértékei közötti különbségeket Student „t” teszttel értékeltük.

Előkísérlet

Ennek a kísérletnek a során az egyes fémek oldatában az inkubációt megelőzően 30 perces fűrésztéses kezelést alkalmaztunk.

1. táblázat Az elhalt és a rendellenesen fejlődő csirke embriók aránya (%) az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses nehézfém terhelés hatására

	46-50 óra		69-70 óra		10. nap		16. nap		19. nap	
	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes
Kontroll	0	0	0	0	20	0	0	0	28,6	14,3
Cd1	0	0	0	0	28,6	28,6	0	0	0	0
Cd2	14,3	0	0	0	28,6	28,6	0	0	0	0
Cr1	0	0	20	20	37,5	37,5	0	0	16,7	16,7
Cr2	0	0	0	0	33,3	33,3	0	0	0	0
Ni1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ni2	0	0	0	0	28,6	28,6	0	0	16,7	16,7

2.táblázat A csirke embrió máj homogenizátum malondialdehid (MDA) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses nehézfém terhelés hatására

Kezelés	MDA ($\mu\text{mol/g}$)					
	16. nap		18. nap		kelést követően	
	átlag	SD \pm	átlag	SD \pm	átlag	SD \pm
Kontroll	3,20	1,00	1,58	0,28	0,68	0,27
Cd1	1,76*	0,48	1,47	0,42	0,93	0,33
Cd2	3,47	2,73	1,42	0,23	0,96	0,22
Cr1	2,89	0,84	0,92**	0,21	0,98	0,25
Cr2	2,37	1,01	1,19	0,30	0,28	0,37
Ni1	2,83	1,75	1,29	0,31	0,93	0,16
Ni2	1,95*	0,23	1,66	0,50	0,91	0,29

Szignifikancia szint: (a kontrollhoz viszonyítva) * - $P < 0,05$, ** - $P < 0,01$

3. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 g szupernatans frakció redukált glutation (GSH) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses nehézfém terhelés hatására

Kezelés	GSH (umol/g 10.000 g szupernatans fehérje)					
	16. nap		18. nap		kelést követően	
	átlag	SD±	átlag	SD±	átlag	SD±
Kontroll	0,86	0,23	0,85	0,13	0,89	0,21
Cd1	0,75	0,08	0,72	0,08	1,31*	0,27
Cd2	0,84	0,31	0,86	0,14	1,16	0,14
Cr1	0,68	0,10	1,04	0,45	1,12	0,16
Cr2	0,63	0,18	0,72	0,13	1,30*	0,25
Ni1	0,90	0,24	0,77	0,15	1,34	0,42
Ni2	0,88	0,19	0,73	0,10	1,27	0,41

Szignifikancia szint: (a kontrollhoz viszonyítva) P<0,05

4.táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 szupernatans frakció glutation-peroxidáz (GSH-Px) aktivitásának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses nehézfém terhelés hatására

Kezelés	GSH-Px (E/g 10.000 g szupernatans fehérje)					
	16. nap		18. nap		kelést követően	
	átlag	SD±	átlag	SD±	átlag	SD±
Kontroll	1,07	0,52	0,57	0,08	0,90	0,18
Cd1	1,27	0,45	0,51	0,11	1,23*	0,20
Cd2	1,07	0,21	0,59	0,35	1,03	0,36
Cr1	0,97	0,18	1,24*	0,46	0,76	0,66
Cr2	0,90	0,36	0,69*	0,08	0,85	0,25
Ni1	0,77	0,19	0,65	0,12	0,74	0,28
Ni2	0,69	0,36	0,71**	0,06	0,57*	0,15

Szignifikancia szint: (a kontrollhoz viszonyítva) * - P<0,05, ** - P<0,01

Az előkísérlet eredményeiből levonható következtetések:

A nagy mennyiségű fémterhelés, amennyiben az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses módszerrel történt, nem idézett elő konzekvens és statisztikailag értékelhető morfológiai elváltozásokat a csirke embrió modellben.

A kezelések nem idéztek elő lényeges változást a lipidperoxid státuszban sem, míg az anti-oxidáns védelmi rendszer vizsgált mutatói esetében, a króm és a nikkelt nagyobb dózisú kezelések hatására jelentős aktiválódást mutattak a glutation peroxidáz esetében.

Fürösztéses kísérletek
Nikkel

5. táblázat: A tojások nikkel-tartalma a fürösztéses nikkel terhelés után

Kezelés	Ni-koncentráció (mg/kg)
Kontroll	0,02
Ni1	0,12
Ni2	0,12
Ni3	0,14

6. táblázat Az elhalt és a rendellenesen fejlődő csirke embriók aránya (%) az inkubációt megelőzően alkalmazott fürösztéses nikkel terhelés hatására

	46-50 óra		69-70 óra		10. nap		16. nap		19. nap	
	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes
Kontroll	0	0	1,8	0	3,6	1,8	0	0	0	0
Ni1	0	0	0	0	4,4	4,4	1,5	1,5	3,0	0
Ni2	0	0	1,5	1,5	1,5	0	1,5	1,5	1,5	0
Ni3	1,5	1,5	3,0	3,0	0	0	0	1,5	3,0	0

7. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum C-vitamin tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fürösztéses nikkel terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	C-vitamin tartalom (mg/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	16,70 \pm 1,68	17,82 \pm 4,14	20,00 \pm 8,02
Ni1	17,44 \pm 5,23	17,89 \pm 1,80	15,52 \pm 5,60
Ni2	20,67 \pm 4,62	15,03 \pm 2,45	11,85 \pm 2,68
Ni3	17,99 \pm 4,24	18,14 \pm 2,02	19,42 \pm 6,52

8. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum malondialdehid (MDA) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fürösztéses nikkel terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	MDA tartalom (μ mol/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	2,62 \pm 0,85	3,37 \pm 1,44	1,97 \pm 0,15
Ni1	4,98* \pm 2,89	2,77 \pm 0,41	2,53* \pm 0,62
Ni2	3,13 \pm 0,35	2,43 \pm 0,44	1,75 \pm 0,45
Ni3	3,10 \pm 0,58	2,69 \pm 0,63	2,13 \pm 0,19

Szignifikancia szint: * = P<0,05

9. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 g szupernatans frakció redukált glutation (GSH) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses nikkkel terhelés hatására (átlag ± S.D.)

Kezelés	GSH tartalom (μmol/g fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	1,42±0,07	1,22±0,08	1,89±0,73
Ni1	1,60*±0,06	1,32±0,38	2,22±0,48
Ni2	1,41±0,11	1,39±0,12	2,31±0,40
Ni3	1,44±0,23	1,61*±0,42	1,75±0,39

Szignifikancia szint: * = <0,05

10.táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 szupernatans frakció glutation-peroxidáz (GSH-Px) aktivitásának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses nikkkel terhelés hatására (átlag ± S.D.)

Kezelés	GSHPx aktivitás (E/g fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	1,08±0,14	0,92±0,06	1,51±0,23
Ni1	1,01±0,25	1,10±0,53	2,07*±0,37
Ni2	1,08±0,35	1,29±0,31	1,37±0,31
Ni3	1,00±0,11	1,32*±0,22	1,46±0,32

Szignifikancia szint: * = P<0,05

Kadmium

11. táblázat: A tojások kadmium-tartalma a fűrésztéses kadmium terhelés után

Kezelés	Cd-koncentráció (mg/kg)
Kontroll	<0,01
Cd1	<0,01
Cd2	<0,01
Cd3	<0,01

12. táblázat Az elhalt és a rendellenesen fejlődő csirke embriók aránya (%) az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses kadmium terhelés hatására

	46-50 óra		69-70 óra		10. nap		16. nap		19. nap	
	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes
Kontroll	1,6	0	1,6	0	7,8	3,1	4,7	0	1,6	0
Cd1	0	1,5	1,5	1,5	9,2	0	4,6	1,5	3,1	0
Cd2	3,2	0	0	0	3,2	0	1,6	0	3,2	0
Cd3	4,6	1,5	0	1,5	6,2	0	3,1	0	3,1	0

13. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum C-vitamin tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses kadmium terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	C-vitamin tartalom (mg/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	35,39 \pm 2,94	30,65 \pm 18,70	16,81 \pm 4,29
Cd1	34,99 \pm 7,37	28,08 \pm 11,82	14,82 \pm 3,86
Cd2	40,18 \pm 4,48	23,10 \pm 5,46	13,93 \pm 1,89
Cd3	48,67* \pm 11,80	26,63 \pm 6,27	14,10 \pm 2,58

Szignifikancia szint: * = P<0,05

14. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum malondialdehid (MDA) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses kadmium terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	MDA tartalom (μ mol/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	5,25 \pm 2,82	2,51 \pm 0,39	3,60 \pm 0,34
Cd1	4,00 \pm 3,75	2,69 \pm 0,27	3,55 \pm 0,51
Cd2	3,14 \pm 0,61	4,55** \pm 0,55	3,78 \pm 0,47
Cd3	3,40 \pm 0,55	4,11** \pm 0,81	3,18 \pm 0,39

Szignifikancia szint: ** =P<0,01

15. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 g szupernatans frakció redukált glutation (GSH) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses kadmium terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	GSH tartalom (μ mol/g fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	2,33 \pm 0,88	1,30 \pm 0,35	1,33 \pm 0,21
Cd1	1,46 \pm 0,64	1,32 \pm 0,20	1,04* \pm 0,07
Cd2	0,86* \pm 0,16	1,00 \pm 0,25	1,19 \pm 0,21
Cd3	1,10* \pm 0,28	0,97 \pm 0,33	1,69 \pm 0,50

Szignifikancia szint: * = P<0,05

16. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 szupernatans frakció glutation-peroxidáz (GSH-Px) aktivitásának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses kadmium terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	GSHPx aktivitás (E/g fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	0,65 \pm 0,60	1,69 \pm 0,33	0,84 \pm 0,10
Cd1	1,36 \pm 0,51	1,81 \pm 0,33	0,89 \pm 0,12
Cd2	1,18 \pm 0,22	0,71*** \pm 0,09	0,93 \pm 0,10
Cd3	1,15 \pm 0,26	0,69*** \pm 0,10	1,01 \pm 0,27

Szignifikancia szint: *** = P<0,001

Króm

17. táblázat: A tojások króm-tartalma a fűrésztéses króm-terhelés után

Kezelés	Cr-koncentráció (mg/kg)
Kontroll	0,39
Cr1	0,35
Cr2	0,31
Cr3	0,32

18. táblázat Az elhalt és a rendellenesen fejlődő csirke embriók aránya (%) az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses kadmium terhelés hatására

	46-50 óra		69-70 óra		10. nap		16. nap		19. nap	
	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes
Kontroll	0	0	0	0	0	0	0	0	1,8	0
Cr1	3,5	0	1,8	0	1,8	1,8	0	0	1,8	0
Cr2	3,9	0	0	0	5,6	0	0	0	0	0
Cr3	3,8	0	0	0	3,8	3,8	1,9	1,9	0	0

19. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum C-vitamin tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses króm terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	C-vitamin tartalom (mg/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	41,09 \pm 6,79	25,49 \pm 3,01	10,08 \pm 4,36
Cr1	39,65 \pm 7,68	28,21 \pm 3,34	9,53 \pm 1,65
Cr2	43,07 \pm 9,16	25,53 \pm 5,00	16,21 \pm 17,08
Cr3	46,90 \pm 4,81	25,60 \pm 2,42	13,52 \pm 5,44

20. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum malondialdehid (MDA) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses króm terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	MDA tartalom (μ mol/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	1,18 \pm 0,74	3,08 \pm 0,97	2,06 \pm 1,07
Cr1	1,33 \pm 0,52	3,85 \pm 0,57	1,45 \pm 0,58
Cr2	1,12 \pm 0,19	2,51 \pm 1,13	1,92 \pm 0,96
Cr3	1,09 \pm 0,35	1,98 \pm 1,16	1,81 \pm 0,89

21. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 g szupernatans frakció redukált glutation (GSH) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses króm terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	GSH tartalom ($\mu\text{mol/g}$ fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	0,91 \pm 0,14	0,95 \pm 0,24	1,25 \pm 0,14
Cr1	1,00 \pm 0,08	1,15* \pm 0,23	1,48 \pm 0,15
Cr2	0,90 \pm 0,08	1,21 \pm 0,46	1,27 \pm 0,23
Cr3	1,05 \pm 0,11	1,17 \pm 0,20	1,41 \pm 0,28

Szignifikancia szint: $P < 0,05$

22. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 szupernatans frakció glutation-peroxidáz (GSH-Px) aktivitásának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses króm terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	GSHPx összesítés (E/g fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	1,08 \pm 0,38	1,06 \pm 0,34	1,49 \pm 0,47
Cr1	0,99 \pm 0,08	1,48* \pm 0,19	1,49 \pm 0,33
Cr2	1,02 \pm 0,08	1,33 \pm 0,24	1,29 \pm 0,26
Cr3	1,07 \pm 0,09	1,34 \pm 0,25	1,33 \pm 0,57

Szignifikancia szint: * = $P < 0,05$

A fűrésztéses kísérletek eredményeiből levonható következtetések:

A fűrésztéses kezelés egyik fém esetében sem idézett elő szignifikáns mértékű morfológiai elváltozásokat. Ezzel szemben egyes vizsgált biokémiai paraméterekben változás volt kimutatható.

A **nikkel** a legkisebb koncentrációjú kezelés esetében mutatott markáns változásokat, mint-hogy az embrionális fejlődés 16. napján ill. a kelést követően közvetlenül vett májmintákban ebben a csoportban jelentősen megnőtt a malondialdehid koncentráció, azaz feltehetően nőtt a lipidperoxidációs folyamatok intenzitása. Ezzel párhuzamosan viszont a glutation-peroxidáz aktivitás szignifikáns mértékű csökkenést mutatott, ami fenti hipotézisünket alátámasztja.

Kadmiummal történt kezelés hatására a keltetés 18. napja bizonyult kritikusnak, mivel a nagyobb koncentrációjú oldattal kezelt Cd2 és Cd3 csoportokban szignifikánsan nagyobb MDA koncentrációt mértünk, miközben a GSHPx aktivitás szignifikánsan csökkent, ami a nikkelhez hasonlóan fokozott lipidperoxidációra utal.

Króm hatására a nikkelhez hasonlóan szintén a legkisebb koncentráció alkalmazása esetén tapasztalunk markáns változásokat az antioxidáns védelmi rendszer vizsgált paramétereiben. Így a kelést közvetlenül követően történt mintavételkor a májban nagyobb volt a kontrollhoz viszonyítva a malondialdehid koncentráció, miközben viszont ebben az esetben nagyobb GSH koncentrációt és nagyobb GSHPx aktivitást is mértünk. Ebben az esetben a fokozott lipidperoxidáció tehát még nem csökkentette, hanem aktiválta az antioxidáns védőrendszert.

A légkamrába történő injektálással végzett kezelések

Nikkel

23. táblázat: A kikelt csibék májának nikkeltartalma injektálással végzett nikkel terhelés után

Csoport	Ni-koncentráció (mg/kg)
Kontroll	0,19
Ni1	0,12
Ni2	0,10
Ni3	0,14

24. táblázat Az elhalt és a rendellenesen fejlődő csirke embriók aránya (%) az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett nikkel terhelés hatására

	46-50 óra		69-70 óra		10. nap		16. nap		19. nap	
	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes
Kontroll	1,6	0	0	0	14,5	3,2	0	0	8,1	0
Ni1	3,0	0	0	0	7,6	0	7,6	0	6,1	0
Ni2	3,0	0	1,5	1,5	9,0	1,5	1,5	0	9,0	0
Ni3	5,6	0	1,4	1,4	16,7	4,2	0	0	9,7	4,2

25. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum C-vitamin tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett nikkel terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	C-vitamin tartalom (mg/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	16,70 \pm 1,68	17,82 \pm 4,14	20,00 \pm 8,02
Ni1	17,44 \pm 5,23	17,89 \pm 1,80	15,52 \pm 5,60
Ni2	20,67 \pm 4,62	15,03 \pm 2,45	11,85 \pm 2,68
Ni3	17,99 \pm 4,24	18,14 \pm 2,02	19,42 \pm 6,52

26. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum malondialdehid (MDA) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett nikkel terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	MDA tartalom (μ mol/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	11,10 \pm 4,02	9,14 \pm 1,77	9,04 \pm 1,30
Ni1	12,70 \pm 3,53	9,00 \pm 1,74	10,53 \pm 3,37
Ni2	9,48 \pm 1,42	9,32 \pm 0,67	8,51 \pm 0,56
Ni3	9,12 \pm 0,65	9,50 \pm 0,35	8,33 \pm 1,34

27. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 g szupernatans frakció redukált glutation (GSH) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett nikkell terhelés hatására (átlag ± S.D.)

Kezelés	GSH tartalom (μmol/g fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	3,39±2,17	3,66±1,30	5,11±1,23
Ni1	3,41±1,89	1,75*±0,14	2,86*±0,84
Ni2	1,60*±0,14	2,00*±0,45	3,48*±0,54
Ni3	2,00*±0,74	1,92*±0,66	1,86*±0,17

Szignifikancia szint: * = P<0,05

28. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 szupernatans frakció glutation-peroxidáz (GSH-Px) aktivitásának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett nikkell terhelés hatására (átlag ± S.D.)

Kezelés	GSHPx aktivitás (E/g fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	1,30±0,41	1,17±0,14	1,58±0,23
Ni1	1,16±0,38	0,79*±0,14	2,77*±0,99
Ni2	1,50±0,35	2,22*±0,60	3,01*±0,91
Ni3	1,81±0,70	1,65±0,61	1,04*±0,30

Szignifikancia szint: * = P<0,05

Kadmium

29. táblázat: A kikelt csibék májának kadmium-tartalma injektálással végzett kadmium terhelés esetén

Csoport	Cd-koncentráció (mg/kg)
Csapvizes = kontroll	<0,01
Cd1	0,01
Cd2	0,02
Cd3	0,03

30. táblázat Az elhalt és a rendellenesen fejlődő csirke embriók aránya (%) az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett kadmium terhelés hatására

	46-50 óra		69-70 óra		10. nap		16. nap		19. nap	
	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes
Kontroll	1,6	0	1,6	0	7,8	3,1	4,7	0	1,6	0
Cd1	14,8	4,9	6,6	3,3	23,0	3,3	8,2	3,3	0	0
Cd2	26,8	1,8	3,6	1,8	25,0	7,1	0	0	3,6	0
Cd3	20,7	3,4	5,2	5,2	22,4	6,9	5,2	1,7	1,7	0

31. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum C-vitamin tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett kadmium terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	C-vitamin tartalom (mg/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	26,96 \pm 4,56	18,75 \pm 3,38	19,02 \pm 3,10
Cd1	25,47 \pm 9,14	18,36 \pm 3,77	17,77 \pm 3,01
Cd2	26,39 \pm 4,44	17,61 \pm 1,62	16,90 \pm 3,10
Cd3	30,41 \pm 4,74	18,94 \pm 4,69	18,89 \pm 6,45

32. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum malondialdehid (MDA) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett kadmium terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	MDA tartalom (μ mol/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	5,31 \pm 1,38	8,25 \pm 0,83	3,89 \pm 0,89
Cd1	6,23 \pm 0,99	8,72 \pm 2,63	6,39 \pm 2,13
Cd2	5,32 \pm 0,95	7,15 \pm 0,86	6,99* \pm 1,65
Cd3	4,73 \pm 0,72	8,23 \pm 1,78	7,40* \pm 1,58

Szignifikancia szint: * = P<0,05

33. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 g szupernatans frakció redukált glutation (GSH) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett kadmium terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	GSH tartalom (μ mol/g fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	1,13 \pm 0,20	1,12 \pm 0,11	1,44 \pm 0,15
Cd1	0,95 \pm 0,17	1,28 \pm 0,12	1,33 \pm 0,34
Cd2	0,91 \pm 0,20	1,12 \pm 0,32	1,51 \pm 0,21
Cd3	0,99 \pm 0,02	0,98 \pm 0,14	1,49 \pm 0,14

34. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 szupernatans frakció glutation-peroxidáz (GSH-Px) aktivitásának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett kadmium terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	GSHPx aktivitás (E/g fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	0,86 \pm 0,19	1,02 \pm 0,21	1,33 \pm 0,23
Cd1	0,80 \pm 0,06	0,83 \pm 0,12	1,26 \pm 0,39
Cd2	1,21 \pm 0,53	0,84 \pm 0,11	1,64* \pm 0,04
Cd3	0,76 \pm 0,16	0,80 \pm 0,05	1,30 \pm 0,21

Szignifikancia szint: * = P<0,05

Króm

35. táblázat: A kikelt csibék májának króm-tartalma injektálással végzett króm terhelés esetén

Csoport	Cr-koncentráció (mg/kg)
Kontroll	0,17
Cr1	0,15
Cr2	0,20
Cr3	0,18

36. táblázat Az elhalt és a rendellenesen fejlődő csirke embriók aránya (%) az inkubációt megelőzően alkalmazott fűrésztéses kadmium terhelés hatására

	46-50 óra		69-70 óra		10. nap		16. nap		19. nap	
	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes	Elhalt	Rendellenes
Kontroll	12,8	2,6	0	0	12,8	0	2,6	0	2,6	0
Cr1	16,9	0	5,1	1,7	22,0	8,5	0	0	0	0
Cr2	26,2	4,5	4,5	4,5	27,9	6,6	0	0	0	0
Cr3	17,0	1,7	1,7	0	47,5**	18,6**	0	0	1,7	0

Szignifikancia szint: ** = P<0,01

37. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum C-vitamin tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett króm terhelés hatására (átlag ± S.D.)

Kezelés	C-vitamin tartalom (mg/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	26,96±4,56	18,75±3,38	19,02±3,10
Cr1	26,47±4,83	18,50±1,69	19,16±4,84
Cr2	26,07±4,77	20,75±3,60	29,40***±2,71
Cr3	17,94--- ⁺⁺	20,37--- ⁺⁺	--- ⁺ ---

Szignifikancia szint: *** = P<0,001

⁺ - nem volt kikelt egyed

⁺⁺ - a nagymértékű elhalás miatt csak egy értékelhető adat állt rendelkezésre

38. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum malondialdehid (MDA) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett króm terhelés hatására (átlag ± S.D.)

Kezelés	MDA tartalom (µmol/g)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	5,31±1,38	8,25±0,83	3,89±0,89
Cr1	7,52±4,82	5,27±2,64	6,91*±0,57
Cr2	6,07±2,41	3,74*±0,45	6,39*±1,02
Cr3	13,39--- ⁺⁺	3,94--- ⁺⁺	--- ⁺ ---

Szignifikancia szint: * = P<0,05

⁺ - nem volt kikelt egyed

⁺⁺ - a nagymértékű elhalás miatt csak egy értékelhető adat állt rendelkezésre

39. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 g szupernatans frakció redukált glutation (GSH) tartalmának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett króm terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	GSH tartalom ($\mu\text{mol/g}$ fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	1,13 \pm 0,20	1,12 \pm 0,11	1,44 \pm 0,15
Cr1	0,91 \pm 0,11	0,87 \pm 0,22	1,67* \pm 0,12
Cr2	0,98 \pm 0,19	0,93* \pm 0,11	1,56 \pm 0,25
Cr3	1,19 $^{---+}$	1,02 $^{---+}$	$^{---+}$

Szignifikancia szint: * = P<0,05

$^{+}$ - nem volt kikelt egyed

$^{++}$ - a nagymértékű elhalás miatt csak egy értékelhető adat állt rendelkezésre

40. táblázat A csirke embrió máj homogenizátum 10.000 szupernatans frakció glutation-peroxidáz (GSH-Px) aktivitásának változása az inkubációt megelőzően alkalmazott injektálással végzett króm terhelés hatására (átlag \pm S.D.)

Kezelés	GSHPx aktivitás (E/g fehérje tartalom)		
	16. nap	18. nap	Kelést követően
Kontroll	0,86 \pm 0,19	1,02 \pm 0,21	1,33 \pm 0,23
Cr1	0,78 \pm 0,21	0,58* \pm 0,20	1,36 \pm 0,41
Cr2	0,92 \pm 0,29	0,60* \pm 0,13	1,26 \pm 0,17
Cr3	0,93 $^{---+}$	0,77 $^{---+}$	$^{---+}$

Szignifikancia szint: * = P<0,05

$^{+}$ - nem volt kikelt egyed

$^{++}$ - a nagymértékű elhalás miatt csak egy értékelhető adat állt rendelkezésre

Az injektálással végzett kezelések eredményeiből levonható következtetések

Az injektálással végzett kezelés hatására egyik nehézfém esetében sem volt megfigyelhető a fémek jelentős akkumulációja a kikelt csibék májában.

Bár az injektálás hatására minden kezelésben megnőtt az elhalt embriók aránya és növekedett a morfológiai elváltozások aránya is, ez statisztikailag nem volt szignifikáns. Az egyetlen kivételt a Cr3 csoportban 3-10. nap között tapasztalt embrióelhalás, amely szignifikánsan meghaladta a kontroll csoportban azonos időszakban talált elhalt embriók számát. Az injektálással végzett kezeléseket esetében tapasztalt nagy arányú korai elhalás (0-48 órában) feltehetően a kezelési technika és nem a fémek hatásának eredménye.

A **nikkelterhelés** hatására a redukált glutation koncentráció minden csoportban és csaknem minden vizsgálati időpontban szignifikánsan kisebb értéket mutatott az azonos időpontban mért kontroll értékekhez viszonyítva, amely az antioxidáns rendszer fokozott terhelésére utal. Ezt támasztja alá a glutation-peroxidáz aktivitás nagyobb értéke is az inkubáció 18. napján minden csoportban és a kelést követően a Ni1 és Ni2 csoportban. A malondialdehid tartalom érdemben nem változott, amely viszont azt jelzi, hogy a feltehetően fokozott lipid peroxidációt az antioxidáns rendszer hatékonyan kivédte.

A **kadmiumterhelés** hatására a malondialdehid koncentráció szignifikáns mértékű növekedése a kelést követően a kontroll egyedekben mért értékekhez képest fokozott lipidperoxidációs folyamatokat jelez, amelyet a glutation-peroxidáz aktivitás növekedése is alátámaszt, különösen a Cd2 csoportban.

A **krómterhelés** a kelést követően szintén jelentős lipidperoxidációs terhelést jelentett a csibék számára, amelyet a malondialdehid koncentráció számottevő emelkedése jelez. Ezt megelőzően viszont az inkubáció 18. napján történt mintavétel során nyert májmintákban a glutation-peroxidáz aktivitás szignifikáns mértékben alacsonyabb volt a kontroll csoportban mért értékektől mindkét statisztikailag értékelhető csoportban, ami a glutation redox rendszer kimerülése révén magyarázhatja a kelést követően mért fokozott lipidperoxidációt.

Összefoglalóan megállapítható volt, hogy az injektálással végzett fémterhelések oxidatív stresszt és ennek hatására az antioxidáns – jelen esetben glutation - rendszer aktiválódását, illetve kimerülését idézték elő. A hatások a legmarkánsabban a nikkel hatására jelentkeztek.

Nevelési kísérlet

A fémterheléseknek alávetett csirke embriókból kikelt madarakat a kelést követően neveltük a standard brojlercsirke nevelési technológiának megfelelően kereskedelmi forgalomban kapható takarmányokkal és ivóvíz minőségű vízzel itatva azokat a további fémterhelések elkerülése érdekében az embrionális korban bekövetkezett fémterhelések késői hatásának felmérése céljából.

A méréseket az egyes csoportokban kikelt és életképes állatokkal volt csak módunk elvégezni, így az egyes kezelésekből csak a statisztikai elemzésre még alkalmas létszámok esetében végeztünk mintavételeket.

41. táblázat: A nehézfémekkel kezelt tojásokból kikelt csibék májszövetének C-vitamin tartalma (átlag ± S.D.)

Kezelés	C-vitamin tartalom (mg/g)			
	Kelést követően	3 napos korban	5 napos korban	19 napos korban
Kontroll	25,89±2,32	35,44±5,83	34,95±10,03	45,50±6,64
Cr	28,06±3,72	---©	---©	---©
Cd	21,91±3,18	30,39±5,68	30,83±5,90	42,21±10,85
Ni	18,81**±1,49	29,77±6,71	31,00±7,45	---©

Szignifikancia szint: ** = P<0,01

© - nem történt mintavétel, mivel nem állt rendelkezésre szükséges számú vizsgálati állat

42. táblázat: A nehézfémekkel kezelt tojásokból kikelt csibék májszövetének malondialdehid (MDA) tartalma (átlag ± S.D.)

Kezelés	MDA tartalom (µmol/g)			
	Kelést követően	3 napos korban	5 napos korban	19 napos korban
Kontroll	2,57±0,99	2,90±0,88	3,02±0,57	7,84±4,82
Cr	5,86*±0,66	---©	---©	---©
Cd	3,44±2,45	3,89±1,08	3,39±0,66	5,50±3,32
Ni	2,46±0,64	1,96±0,52	3,41±0,83	---©

Szignifikancia szint: * = P<0,05

© - nem történt mintavétel, mivel nem állt rendelkezésre szükséges számú vizsgálati állat

43. táblázat: A nehézfémekkel kezelt tojásokból kikelt csibék májszövetének redukált glutation (GSH) tartalma (átlag ± S.D.)

Kezelés	GSH tartalom (µmol/g fehérje tartalom)			
	Kelést követően	3 napos korban	5 napos korban	19 napos korban
Kontroll	1,30±0,27	2,20±0,62	3,10±0,62	3,30±0,46
Cr	0,82*±0,00	---©---	---©---	---©---
Cd	1,27±0,58	2,18±0,73	3,05±0,34	3,18±0,56
Ni	1,29±0,40	1,82±0,56	2,31±0,51	---©---

Szignifikancia szint: P<0,05

© - nem történt mintavétel, mivel nem állt rendelkezésre szükséges számú vizsgálati állat

44. táblázat: A nehézfémekkel kezelt tojásokból kikelt csibék májszövetében mérhető glutation-peroxidáz (GSHPx) aktivitás (átlag \pm S.D.)

Kezelés	GSHPx összesítés (E/g fehérje tartalom)			
	Kelést követően	3 napos korban	5 napos korban	19 napos korban
Kontroll	1,40 \pm 0,32	2,00 \pm 0,71	2,71 \pm 0,56	2,87 \pm 0,12
Cr	1,60 \pm 0,08	---©---	---©---	---©---
Cd	1,33 \pm 0,47	2,11 \pm 0,66	2,30 \pm 0,33	2,89 \pm 0,28
Ni	1,18 \pm 0,43	1,47 \pm 0,71	1,86* \pm 0,40	---©---

Szignifikancia szint: **P<0,05**

© - nem történt mintavétel, mivel nem állt rendelkezésre szükséges számú vizsgálati állat

A nevelési kísérletből levonható következtetések:

A nevelési kísérletben a krómmal és a nikkellel terhelt, az inkubációt megelőzően injektálással kezelt csoportokból a keltetés során szükséges számú morfológiai vizsgálatokhoz felhasznált és az elhalt embriók nagy száma miatt csupán kevés életképes egyed kelt ki. Ezért a kísérlet eredményei csak korlátozottan vehetők figyelembe és annak eredményei csak előzetes eredménynek tekinthetők.

A közölt, hangsúlyozottan előzetes, eredmények azonban arra utalnak, hogy a **krómmal** történő injektálás hatására, ahogy arra már korábban is utaltunk, a kelést követően közvetlenül vett mintavételek esetén jelentős oxidatív stressz és a glutation rendszer kimerülése mutatható ki a májban. Erre utal a kontrollhoz képest szignifikánsan nagyobb malondialdehid és számottevően kisebb redukált glutation koncentráció.

A **nikkel** terhelés esetében a glutation-peroxidáz aktivitás a kelést követően, valamint a vizsgált rövid nevelési időszak során elmaradt a kontroll értékhez viszonyítva, amely eltérés 5 napos korban szignifikáns mértékű volt, ami csökkent antioxidáns védelemre utal, bár ennek hatása a lipidperoxidációs folyamatokra, jelen esetben a malondialdehid tartalomra még nem volt kimutatható.

A **kadmium** terhelés hatása a nevelési kísérlet során nem mutatott számottevő változásokat sem a lipidperoxidációs folyamatokban, sem a glutation redox rendszer mennyiségében illetve aktivitásában.