

A természetes eredetű karotinoidok metabolizmusa tyúkfélékben

Zárójelentés

Bevezetés

Az ember/állat karotinoid-ellátottságának értékelése világszerte egyre gyakoribb. Epidemiológiai tanulmányok azt mutatják, hogy a karotinoid tartalmú élelem/takarmány mennyiségben történő fogyasztása számos megbetegedés (tumorok, AMD, CVD, immunhiányos állapotok) kockázatának csökkenésével áll összefüggésben.

A madarak karotinoid metabolizmusa számos jellegzetességet mutat, ami a táplálék karotinoidjai, azok hasznosulása (felszívódás \Rightarrow tárolás \Rightarrow kiürülés) és *in vivo* metabolizációja miatt jelentősen eltér az emlősöktől.

A házimadarokban érvényesülő specifikus metabolikus történések mellett, mivel azok egyben táplálékunknak is tekinthetők, a karotinoid metabolizmus vizsgálata egyben az állati eredetű élelmiszerek minősége, valamint táplálkozástudományi nézőpontból is figyelmet érdemel.

A szövegben alkalmazott rövidítések

BC – β -karotin, LU – lutein, LY – likopin, BCX – β -kriptoxantin, ZX – zeaxantin, ROL – retinol, RAL – retinal, RIL – retinil-észter, TG – triglicerid, PM – portomikron.

A karotinoidmetabolizmus vizsgálatához alkalmazott alaptakarmány kialakítása

Mivel a karotinoidok a növényvilágban széles körben elterjedt vegyületek, fontosnak tartottuk, hogy karotinoid mentes takarmányt állítsunk elő. Ezt, a tojóbaromfi (tyúk, fűj) számára optimális paramétereket jelentő tojótáp összetevőinek figyelembe vételével tettük meg úgy, hogy a tojótápokban szokásosan alkalmazott zeaxantin (ZX), lutein (LU) és β -karotin (BC) tartalmú kukoricát (LU+ZX >>> BC) rizzsel cseréltük ki (1. táblázat). A takarmányok VIS spektrumának felvétele igazolta, hogy az előállított keverék nem tartalmazott karotinoidokat. A vitamin adalékokat a szokásos premix komponensekből úgy állítottuk össze, hogy kihagytuk közülük a retinil-acetátot, így a kísérleti takarmány egyben A-vitamin mentes is volt.

1. táblázat

A kontroll és a kísérleti takarmány összetétele			
KONTROLL ¹	%	KÍSÉRLETI	%
kukorica	41,6	rizs (hántolt)	40
búza	20,5	szója (FF)	16
extr. szója	15	extr. szója	13,3
szója (FF)	10	árpa	20
tak. mész	7	tak. mész	8
üek ²	2	MCP	1,5
zeolit	1	Biometin	0,8
mészközúzalék	1,4	Tak. só	0,3
Fylax vizes oldata ³	1,5	Labek ⁴	0,124

¹Farmerat HT-tojó takarmánykeverék (Farmer Prompt Kft. – Zagyvaszántó)

²üzemi előkeverék, amely vitaminokat, AVIZANT ORANGE színezékeket, nyomelemeket, aminosavakat és gyógyszereket tartalmaz

³puffer anyag

⁴a laboratóriumunkban készült A-vitamint nem tartalmazó vitamin, és nyomelem keverék.

Ezt a takarmányt alkalmaztuk minden olyan esetben, amikor a karotinoidok specifikus egyedi színező hatásának, ill. az egymás közötti kölcsönhatásának a vizsgálata volt a cél.

Felszívódási vizsgálatok

Több természetes eredetű, eltérő szerkezetű és polaritású karotinoiddal (hidrokarbon karotinoidok: BC; LY; oxikarotinoidok: BCX; LU; ZX) végeztünk felszívódási vizsgálatokat

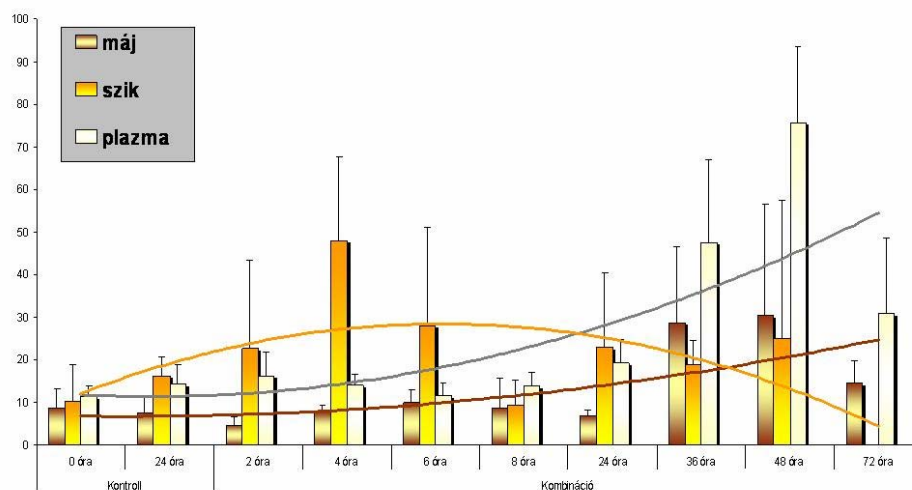
napos csibékben és tojótyúkokban. A karotinoid mennyiséget, minden esetben, egy dózisban *p.os* szondán adagoltuk a várható napi takarmányfelvétel mennyiségi viszonyainak figyelembevételével.

Napocsibék

A természetes eredetű karotinoidok (BCX, LU, LY) felszívódását tanulmányoztuk napocsibékben közvetlenül a kikelést követően, a harmadik életnapig (0-72. óra). A kísérletet 56 db napos csibével végeztük. A kezelt állatok a következő kiegészítésben részesültek: 5 ppm lutein (*Tagetes erecta* kivonat - *Capsanta* EBS 40 NT: 82,0 % transz-LU tartalmú) és 5 ppm likopin (paradicsom sűrítmény – Globusz Rt.). Az adagolást napraforgó olajjal és vízzel készített szuszpenzió formájában szondán át végeztük. A kezelést követően az állatokat a 2., 4., 6., 8., 24; 36; 48; illetve 72. órában elvéreztettük, a szikzacskót és a májat kipreparáltuk. A vágás alkalmával bélsármintákat is vettünk. A szérum, a szövet, és bélsár mintákból direkt extrakciót követően normál fázison izokratikus HPLC-technikával meghatároztuk a karotinoid profilt.

A szikbéljárat által a bélcsatornába jutó, a szikzacskóban tárolt karotinoidok felszívódása a meghatározó az első életnapon. Napocsibék esetében sem a szérum, sem a máj karotinoidjai között nem sikerült LY-t detektálni. Ezt az bizonyítja, hogy szokásos karotinoid összetételű (LU+ZX >>> BC) alaptakarmány fogyasztása esetén a szik karotinoidjai közül értelemszerűen hiányzó LY *p.os* adása esetén sem jelent meg a vér karotinoid frakciójában.

Jellemzően alakultak a LU-szintek a vizsgált szövetekben. A szikben a 24. órára már csökkenő, a májban és a szérumban, pedig emelkedő LU értékeket regisztráltunk (*LU. ábra*). A kontroll állatokban a kezelt állatokhoz hasonló jellegű, de koncentrációban kifejezve kisebb értékekkel volt jellemezhető ezen oxi-karotinoid profil változása. A későbbi mintavételek alkalmával a LU tovább csökkent a szikben, míg a plazmában a 48. óráig emelkedett, majd a harmadik életnapra a 24 órás érték tartományába tért vissza. A kelést követő 24 órában a karotinoid felszívódásban aktív szerepet játszó vékonybélszakasz az intenzív szik → bél transzport eredményeképpen mintegy tamponálódott a karotinoidokban bővelkedő saját szikanyaggal, ami így nem tette lehetővé a *p.os* adagolt karotinoidok hatékony felszívódását. Feltételezhető, hogy ez a hatás legalább az élet első három napján érvényesül, amikor a szik a kezdeti tömegének az 1/5-re zsugorodik.



LU ábra

A LU-koncentráció alakulása a kelést követő 0-72. órában napos csibék vérplazmájában, májában és a szikzacskóban

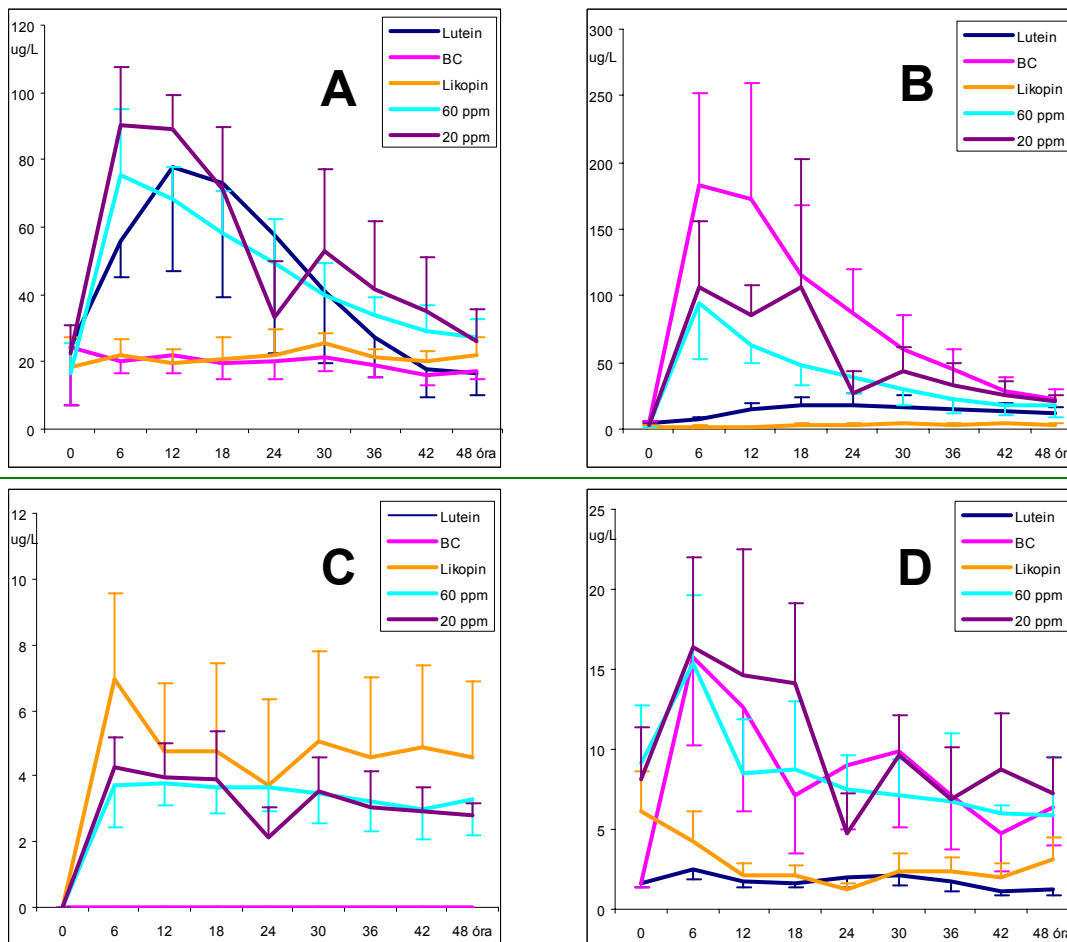
Felnőtt tyúkok

Felnőtt tojótyúkokkal (*Bovans Nera* n=8/kezelés) végzett kísérleteinkben egyszeri, 20ppm karotinoid *p.os* adagolását követően a vérplazma HPLC analízisével vizsgáltuk a vérplazmából kimutatható karotinoidok kinetikáját (0-48 h).

A kiegészítést a tyúkok által átlagosan ismert napi takarmány-fogyasztás és irodalmi adatok alapján számítottuk: 20 ppm karotinoid/állat (357 mg Lutein CWS/S-TG 5,6%; 192,3 mg β -karotin 10,4%; 384,6 mg Redivivo likopin 5,2%); ennek kétféle kombinációja 1. amikor a 20ppm karotinoid/állat karotinoidonként 1/3-ad részből (6,6 ppm LU + 6,6 ppm BC + 6,6 ppm LY) tevődik össze és 2. amikor 3 x 20 ppm karotinoid/állat (20 ppm LU + 20 ppm BC + 20 ppm LY) volt a dózis. Az alkalmazott vízben oldódó karotinoid készítményekből kimért mennyiségeket napraforgó olajjal 1:1 arányban összekevertük. A szuszpenziót szondán át az állatok begyébe juttattuk. Az egyszeri karotinoid kiegészítést követően az állatok *ad libitum* fogyaszthatták az alaptakarmányt és az ivóvizet. A kísérlet kezdetekor (0. óra), majd 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 és 48 óra elteltével egyedi vérvételre került sor. A mintákból HPLC technikával karotinoid (LU+ZX, BCX, LY, BC) és retinoid (ROL, RP) profil; valamint TG, Chol meghatározást végeztünk. A karotinoidok antioxidáns hatásának jellemzésére a plazmából vasredukációs tesztet (FRAP) végeztünk, ill. meghatároztuk a vörösvérsejt hemolizátum tiobarbutirsav-reaktív-anyag (TBARS) szintjét.

Eredmények

- Mindhárom, általunk alkalmazott karotinoid (LY, BC, LU) esetében, mind egyedileg, mind keverékként történő adagolásukat követően, az adott karotinoid szignifikáns mértékű megemelkedését tapasztaltuk a vérmintákban a kezdeti időponthoz viszonyítva. Az adott karotinoid koncentráció emelkedésének mértéke valószínűsíthetően összefüggésben van a molekulák eltérő szerkezetéből (polaritásából, azaz oldékonyságából) következő portomikronba történő beépülés arányával.



ábra

Vérplazma karotinoid és retinoid profilok p.os adagolást követően (0-48ó.) tojótyúkokban
A: lutein, B: β -karotin, C: likopin, D: retinil palmitát

- A karotinoid koncentráció vérbeli csúcspontja LU esetében a kiegészítést követő 12. órában, míg a BC és a LY esetében a 6. órában jelentkezett. A karotinoidok akkumulálódásában és tárolásában tapasztalt különbségek a különböző karotinoidok esetében a polaritás függő szelektív felszívódási és szállítási folyamatok meglétét támasztják alá.
- A vérplazma BC és LU értékei a maximális szintet elérve további utánpótlás hiányában fokozatosan visszatértek a kiindulási szintre, ezzel szemben a likopin esetében tapasztalt kisebb mértékű növekedés a vizsgált karotinoidok közül legkevésbé poláros molekula eltérő jellegű szállításának tulajdoníthatóan a likopin sokkal lassúbb eltűnését (kiürülését) eredményezte.
- Egyéb fajokban közölt adatokhoz hasonlóan a többi vizsgált karotinoiddal azonos koncentrációban adagolt LY adagolásakor sokkal kisebb mértékű abszorpciót tapasztaltunk, mint a LU, illetve a BC esetében.
- Abban az esetben, ha a karotinoidokat együttesen adagoltuk, a kisebb dózis (Σ 20ppm) mindhárom karotinoid vonatkozásában nagyobb koncentráció-emelkedést eredményezett, ami a nagyobb dózis (3x20ppm) esetében a valószínűsíthető intraluminarisan jelentkező oldékonysági, valamint a mucosa sejtek kötőfehérjéiért (ld.: Kötőfehérje fejezet) folytatott kompetíció miatt következhetett be.
- A vizsgált karotinoidok közül nem minden esetben várhattunk provitamin aktivitást. Ezt igazolta az, hogy szignifikáns növekedést csak a BC tesztlésekor tapasztaltunk az egyedi, valamint az együttes karotinoid kiegészítést követően is a vérminták RP koncentrációiban. Ez a nyálkahártyában lejátszódó hatékony dioxigenáz aktivitást követően képződő retinoid, majd az észterifikáció eredménye volt (BC \rightarrow RAL \rightarrow ROL \rightarrow RIL). A megemelkedő RIL szint a metabolikus hatások (felhasználás és depozíció) eredményeként a vizsgált időintervallum végére (48. óra) visszatért a kiindulási szintre.
- A kombinált adagolások esetében úgy tapasztaltuk, hogy az apoláros karotinoid (LY) rontja a két oxikarotinoid (LU, ZX) hasznosulását.
- A FRAP értékek itt sem jelezték a növekvő antioxidáns kapacitást. A vvs-hemolizátum TBARS szintjei viszont mindhárom karotinoid esetében szignifikánsan csökkentek.

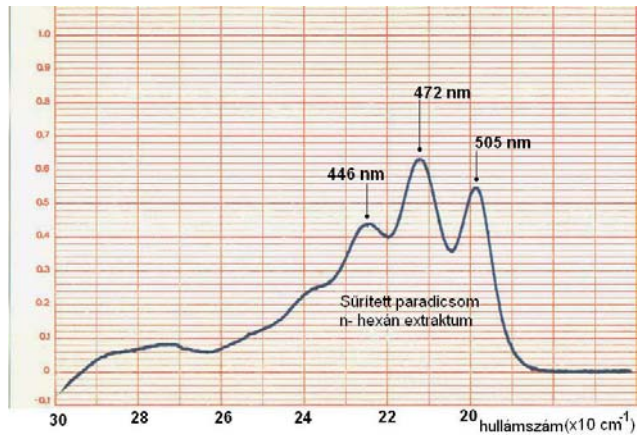
A metabolizmus során kialakuló színező* karotinoid hatás vizsgálata

A karotinoidok jól látható színező hatása nemcsak fajon belüli, de fajok közötti jelzőrendszerként is funkcionál. A baromfitermék előállításban ezt használják ki a színezékek (apo-karotinálok, karotinsavas-észterek stb.) takarmányba történő adagolásával. Ezek az anyagok ui. a madarak lipid metabolizmusába kapcsolódva a karotinoidokra jellemző helyeken (bőr alatti zsírszövet, tojássárgája) deponálódnak. Ezeknek a pigmentáló karotinoidoknak nincs provitamin hatása, így csak színezékek, valamint az izoprén vázuktól eredően többé-kevésbé antioxidáns hatásúnak minősülnek. A világszerte alkalmazott karotinoid-színezékek többsége szintetikus anyag, így tkp. xenobiotikumnak tekinthetők. A természetben előforduló több mint 600 karotinoid színe jelentősen eltér egymástól. Ettől, valamint a saját metabolizmusuktól függően a színező hatásuk is különböző. Egyeseknek a táplálékban és/vagy takarmányban történő alkalmazásával viszont egyre többet foglalkoznak, különösen, mivel a színező tulajdonság mellett az antioxidáns hatásuk révén az *in vivo* jelentkező és káros mértékű is öltő oxidatív hatások kiküszöbölésében vegyi karakterükből fakadóan az antioxidánsok nem enzimatis tagjai közé jól beillenek. A leggyakrabban alkalmazott természetes, nem provitamin karotinoidok az astaxantin és a likopin (LY). Több, ez utóbbi vegyületet tartalmazó anyag különböző adagokban történő takarmányba keverésével vizsgáltuk tojó japán fürjekkel végzett

* A karotinoidokat a legtöbb irodalom pigmentnek nevezi. A pigment, vagy festék nem szinonim megjelölése a színezékeknek. A pigmentekre az a jellemző, hogy valójában nem oldódnak a közegben. A karotinoidok a metabolizmusok során viszont egyenletesen feloldódnak mind a transzport (*lipoprotein*) részecskéikben, mind a szöveti tárolásuk (zsírdepók, tojás szik) helyén, a lipidokban.

modellkísérletekben azt, hogy az erre a fajra jellemző karotinoid metabolizmus változása milyen jellegzetességet mutat.

Likopin hasznosulási kísérletek



1. ábra

A likopinra jellemző VIS spektrum

koncentráció kiszámításánál az 505 nm-es, a legtöbb karotinoidra jellemző 450-470 nm-es sávtól távol eső, maximummal számoltunk. Az összegképletében és molekulásúlyában a β -karotinnal azonos, de gyűrűt nem tartalmazó likopin nem pro-A-vitamin hatású, viszonyítási alapként a β -karotin madarakra jellemző retinoid ekvivalens (RE) mennyiségével számolva végeztük az adagolást.

1. kísérlet

Tojófázisuk elején lévő (8 hetes) fürjeből alakítottuk ki a kezelési, 10-10 egyedből álló csoportokat. A kontroll csoportok (**K**-csoport) takarmányát jelentő tojótáp A-vitamin tartalmának (8333,6 NE/kg) megfelelő RE tartalmú likopint (4,7 mg/kg) tartalmazó paradicsom sűrítmenyt (**LY**-csoport) a kimért takarmány komponensekkel együtt laboratóriumi keverővel gondosan homogenizáltuk. A karotinoid hatás összevetéséhez egy harmadik, szintén a kontroll takarmánnyal megegyező RE mennyiségű β -karotinnal (4,7 mg/kg *Lucarotin 10% BASF*) kiegészített csoportot (**BC**-csoport) is beállítottunk.

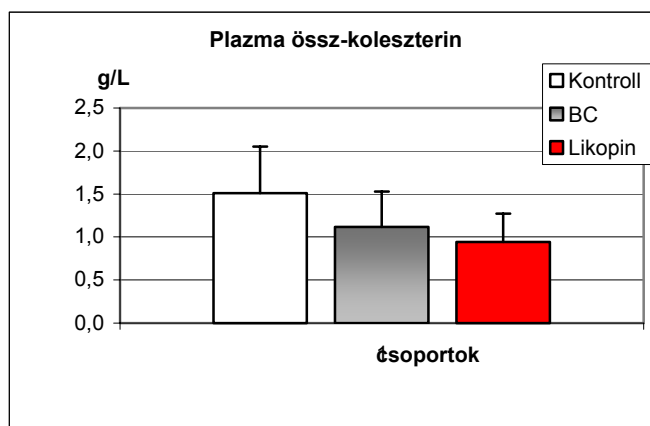
Négy héten át naponta mértük a tojástermelés adatait (darab, súly) és naponta 5-5 tojásból nemzetközi standard színskálához (*Yolk Colour Fan, Roche*) viszonyítva elbíráltuk a színintenzitást.

A kísérlet zárásakor *lege artis* elvéreztetett állatokból vér és májmintákat vettünk. Mind a máj, mind a vérmintákból HPLC-vel meghatároztuk a retinoid és karotinoid profilt. A tojássárgájából és a vérszérumból a lipidmetabolizmus jellemzésére triglicerid (**TG**) és összkoleszterin (**Ch**), az antioxidáns állapot felmérésére **FRAP** meghatározást végeztünk.

A májminták retinoid tartalma jelentős, a tartós tárolás mértékét mutató retinil-palmitát (RP) esetében szignifikáns ($p < 0,05$) csökkenést mutatott a K-csoporthoz viszonyítva (K: $223,2 \pm 4,5$; BC: $216,6 \pm 2,3$; LY: $127,8 \pm 73,4$ $\mu\text{g/g}$). A vitamin tranzit állapotát jelző retinol (ROL) koncentrációkban is ez a tendencia érvényesült: K: $125 \pm 45,8$; BC: $116,4 \pm 60,2$; LY: $83,9 \pm 26,0$ $\mu\text{g/g}$.

A tojássárgája triglicerid (TG) és összkoleszterin (Ch) tartalma mindkét kezelés esetében növekedett, de a LY-kiegészítés esetén kisebb mértékben. A sárgája színének intenzitását kifejező YCF-érték a kontroll tojásokban volt a legkifejezettebb. A BC-csoportban nagyon elhalványodott a sárga szín – igazolva azt a megállapítást, hogy a BC csak kb. 5%-ban játszik szerepet a sárgája színének kialakításában, a LY-kiegészítés viszont azt jelentősen meghaladva stabil szint eredményezett

A vér ROL koncentrációja a LY-csoportban a kezelés végére drámaian csökkent ($p < 0,001$), a BC esetében viszont nem szignifikánsan, de emelkedést mutatott. Ez igazolja, hogy míg a BC pro-A-vitamin aktivitású, addig az aciklikus (jonon gyűrűt nem tartalmazó) LY nem bír ilyen hatással. A plazma karotinoid spektruma jól mutatta, hogy a kísérleti tápot fogyasztó állatok vérében csak az adagolt BC ill. LY csúcsok voltak kimutathatók. A TG szint a vérben nem mutatott jelentős, kezelésfüggő változást. A Ch értékek viszont mindkét kezelésben csökkentek, a LY-csoportban szignifikáns mértékben ($p < 0,01$) (Ch. ábra). Az antioxidáns kapacitás egyik jelzőjeként használható FRAP-értéket a BC-kiegészítés megemelte, de a LY-nak - bár az irodalmi adatok épp ezt a tulajdonságát tartják a legjelentősebbnek - ilyen hatása nem volt.



Ch. ábra

Japán fürjek plazma koleszterin koncentrációja a takarmánv BC és LY kiegészítését követően

Az antioxidáns kapacitás egyik jelzőjeként használható FRAP-értéket a BC-kiegészítés megemelte, de a LY-nak - bár az irodalmi adatok épp ezt a tulajdonságát tartják a legjelentősebbnek - ilyen hatása nem volt.

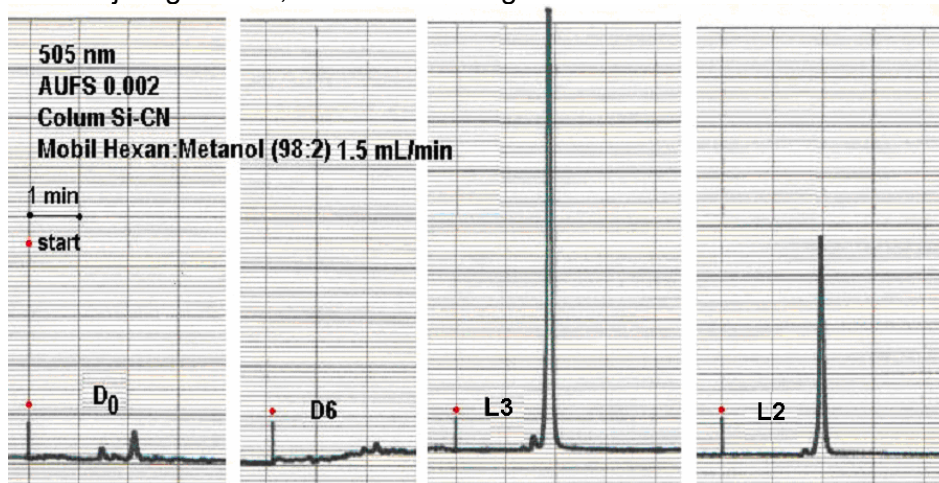
2. kísérlet

Az 1. kísérlet eredményei alapján (a vér és a máj retinoid és karotinoid spektruma, tojástermelési adatok) arra következtettünk, hogy 8 hetes madaraknak jelentős a retinoid és nem elhanyagolható a karotinoid tartaléka, amiknek a metabolizmusa elfedi és megnehezíti az alkalmazott likopin saját hatásának kifejeződését.

A 2. kísérletben egy kiürülési (*depletios*) fázist iktattunk be. A 6-hetes japánfürj tojókat retinoid és karotinoid mentes takarmányon tartottuk 6 héten át. Ezt követően két LY-nal kiegészített takarmányt fogyasztó csoportot alakítottunk ki. Az egyik az első kísérletben alkalmazott LY-kiegészítés kétszeresét (L2), a másik a háromszorosát (L3) kapta egy hónapon át. Mind a depléciós, mind a kezelési szakaszban felvettük az első kísérletben mért paramétereket.

A tojásszám már a 6-hetes kiürítési fázis alatt jelentősen csökkent. Ezt az L2, ill. L3 kezelés sem változtatta meg. A csökkenés egyértelműen a kialakuló A-hipovitaminózis jele, amit az is jelez, hogy a máj RP tartalma jelentősen lecsökkent.

A plazma FRAP a kiürülési időszakban ingadozást jelzett, majd az L3 csoportban tendenciózusan emelkedni kezdett, de az L2 csoportnál nem változott. Ez a likopin dózis függő antioxidáns jellegére utal, bár nem volt szignifikáns a változás.



ábra.

Tojássárgája kivonat kromatogramja likopin depléciót és folyamatos kiegészítést követően

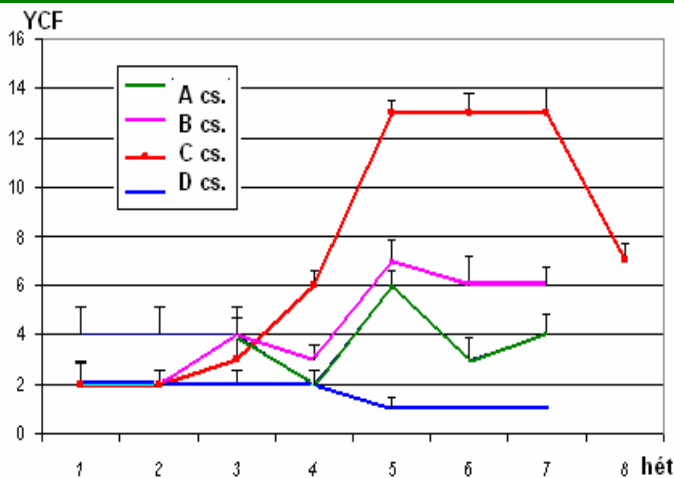
A likopin 505 nm-en jellemző abszorpciós maximumán lemerített tojássárgája hexános extraktum HPLC kromatogramján látható, hogy a depléciós szakasz kezdetén (D0) néhány nem azonosítható kis csúcs, a hat hetes időszak végén (D6) viszont gyakorlatilag semmilyen jel nem mérhető. Az azt követő L2 és L3 kezelés végén a dózissal arányos különbséget jeleztek a likopin retenciós idején kimutatható csúcsok (.*ábra*).

3. kísérlet

Japán fürjek négy csoportját karotinoid mentes takarmánnyal etették, amibe a kiegészítéseket adagoltuk. Az **A** csoport szokásos színezővel (*Charophyll*, DSM) kiegészített; a **B** cs. szárított paradicsom törkölyel 25 mg/kg LY tartalomra, a **C** cs. LY preparátummal (*Redivivo 5% DSM*) 500 mg/tak.kg likopin szintre beállított tápot.; a **D** cs. karotinoid mentes alaptakarmányt fogyasztott 5 héten át.

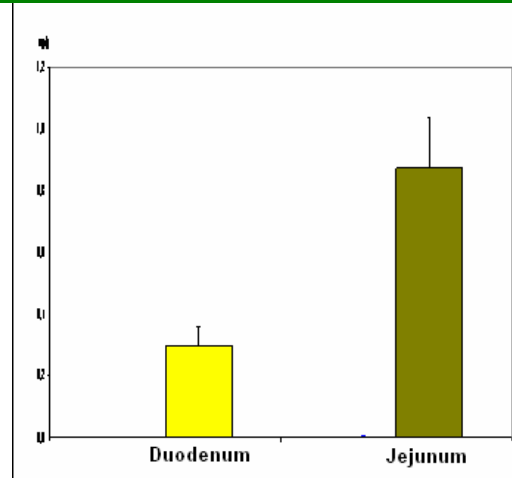
A hetente vett vér- és az összegyűjtött tojásmintákból, valamint 5 hét elteltével a csoportokból kiemelt 3-5 állatból származó máj, és bél-nyálkahártya (*duodenum, jejunum*) mintákból HPLC-technikával mértük a LY koncentrációt. A vér és a tojássárgája vas redukációs képességét módosított FRAP módszerrel, a koleszterin tartalmukat Reanal teszttel, a tojássárgája színét YCF-színskálához viszonyítással mértük.

Megállapítottuk, hogy a legnagyobb LY koncentráció a C csoportban volt mérhető (plazma 128,51 $\mu\text{g/L}$, tojássárgája 7,12 $\mu\text{g/g}$; máj 55,58 $\mu\text{g/g}$). A LY a tojássárgájába épülve jelentős színező hatást fejt ki. Az 5. kísérleti hetet követően az állatokat kereskedelmi tojótáppal etetve a tojássárgája színe a YCF színskála 13-as értékéről 7-es szintre csökkent (*ábra*). A felszívódás helyére utaló adat, hogy a jejunum nyálkahártyája háromszor nagyobb koncentrációban tartalmazta a likopint, mint a duodenum (*ábra*). A vasredukációs képesség mértéke nem változott sem a vérsavóban, sem a tojássárgájában. A koleszterin mennyisége a likopin etetés harmadik hetétől csökkent, mind a vérsavóban, mind a tojássárgájában.



ábra

A tojássárgája színintenzitásváltozása a 3.kísérletben



ábra

A bélfal likopin tartalma C-csoport állataiban

Kísérletünk alapján elmondható, hogy a természetes eredetű karotinoidok közül a likopin japán fürjekben eredményesen színezi, biológiailag aktív anyaggal dúsítja a tojássárgáját, egyben csökkenti a vér és a tojássárgája koleszterin koncentrációját.

Műszeres színmérés

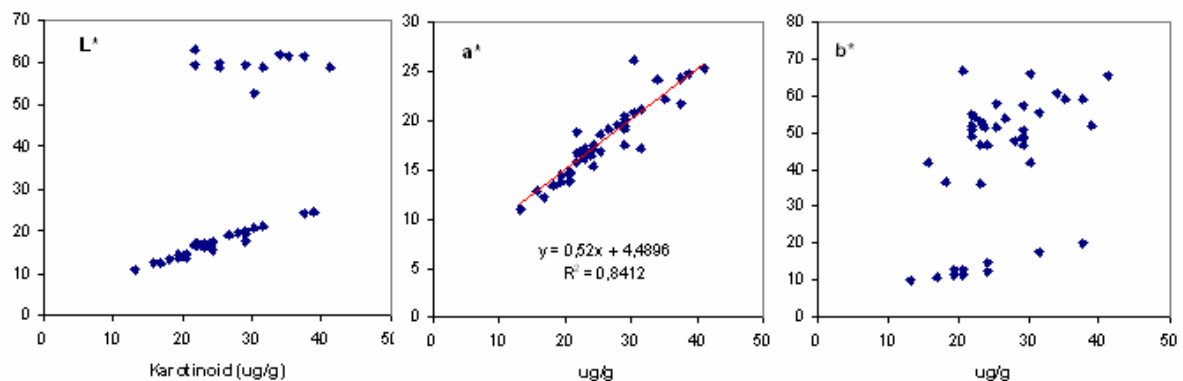
A karotinoid depozíció a vegyületek saját színe miatt jellegzetesen kihat a tárolódási hely (szövet, szerv) színére (vö: bőrszín, tojássárgája).

A tojássárgája színének és karotinoid tartalmának összefüggését elektronikus színmérő készülékkel (*Micromatch™ Plus*, Sheen Instruments Ltd.) elvégzett mérésekkel hasonlítottuk össze. A kézi műszer az International Commission on Illumination (CIE) által ajánlott L^* (luminozitás), a^* (kék - sárga) és b^* (zöld - vörös) értékeket méri (CIELAB).

A nemzetközileg elfogadott Roche skála (*Yolk Colour Fan*, YCF) értékekkel a CIELAB értékek közül eltérő tendenciájú, de lineáris regressziós összefüggést adott az L^* (-) és az a^* (+), a b^* viszont polinomiális (YCF 10-ig lineáris) összefüggést mutatott. Mindhárom értékkel igen szoros korreláció ($r > 0,9$) volt számolható.

A sárgájába történő karotinoid depozíció és színintenzitás összehasonlítása érdekében az összkarotin tartalmat a sárgája hexán kivonatából a tojásra legjellemzőbb oxikarotinoidra, a LU-ra vonatkoztatott moláris abszorpciós koefficiens alapján számítottuk ki. A feltört tojásokat egy megfelelő, a tojássárgáját befogadó mérőedényzet (pl.: portölcsér) használatával analizáltuk a Micromatch készülék segítségével. Mivel a műszer aperturája enyhe nyomással teljes felületével a sárgája felszínére illeszthető, a mérés objektív színminősítést tesz lehetővé.

A 10-40 μg LU/g sárgája karotinoid koncentrációs sávban, mind az a^* „vörös” skála érték erős ($r > 0,8$) és szignifikáns ($p < 0,5$) értéket mutatott. A b^* és a L^* értékek adatait a YCF skálával hasonlítva nem értékelhető összefüggéseket eredményeztek (2. ábra).



2. ábra.

A tojássárgája luteinre vonatkoztatott karotinoid koncentrációja és a CIELAB értékek közötti összefüggések

A bőr színének mérésére ezt az eljárást nem sikerült alkalmazni, sem *in vivo* (a tollzat miatt), sem *post mortem*. Utóbbi esetben ui. a tollaktól megfosztott bőrfelszín a tolltüszők és az alatta lévő szövetek egyenetlensége miatt sem teszi lehetővé az apertura pontos illesztését.

Eredményeink biztatóak egy, a tojássárgája karotinoid tartalmától függő objektív színminősítési eljárás kidolgozására.

Karotinoid kötőfehérje izolálás

A karotinoidok különböző mértékben, de alapvetően apoláros jellegű vegyületek, így feltételezhető, hogy a szervezetben lejátszódó metabolizmusuk és kifejtett hatásaik feltételezik az alapvetően vizes fázisban végbemenő folyamatokba történő kapcsolódásuk érdekében valamilyen segítő mechanizmus, pl.: kötőfehérjék előfordulását. Ezek várhatóan a felszívódásuk helyén, azaz a bélhamban, ill. a tárolás és újraelosztás helyén, azaz a májszövetben feltételezettek. A karotinoid-kötő tényező kimutatását a retinol-kötőfehérje kivonására alkalmazott és leírt különböző háziállatfajokban általunk is eredményesen használt, affinitáskromatográfiás elrendezést kívántuk kialakítani. Ennek lényege: megfelelő mátrixra karotinoidot kötve olyan oszloptöltet alakítható ki, amelyen a szövetekből készített fehérjeizolátumból az a frakció kötődik meg, amelyik affinis a karotinoid struktúrához.

Affinitás kromatográfiás mátrix készítés

Az affinitáskromatográfiás mátrixot egy apoláros ligandum kötésére alkalmas kit (Pierce) vegyszereivel alakítottuk ki. A módszer röviden: kromatográfiás oszlopba töltött 2 mL gélt (*Pharmalink gel*TM – Pierce) kapcsoló pufferral ekvilibráltunk. β -karotint BHT-t tartalmazó dimetil-szulfoxidban oldva (10mg/2ml) és *Pharmalink*TM kapcsoló reagenst töltöttünk az oszlopra, amit lassan forgó rotációs keverőn rázattunk (24 h, 4°C). Az így elkészült β -karotin-

affinitáskromatográfiás oszlopot 50% etanol tartalmú Tris-ammónium-bikarbonát pufferral (50mM Tris-HCl, 50 mM ammonium-bicarbonat buffer = TAB, pH 7,2) átmostuk, hogy a nem kötött β -karotint eltávolítsuk. A mosófolyadékban 450 nm-en mért OD-alapján ellenőriztük a nem kötött BC eltávolítását, ezzel következettünk a kötött mennyiségre is. A reakciókat sötét szobában hajtottuk végre, ill. a kész oszlopot mindenkor alumínium fóliába csavarással védtük a direkt fénytől.

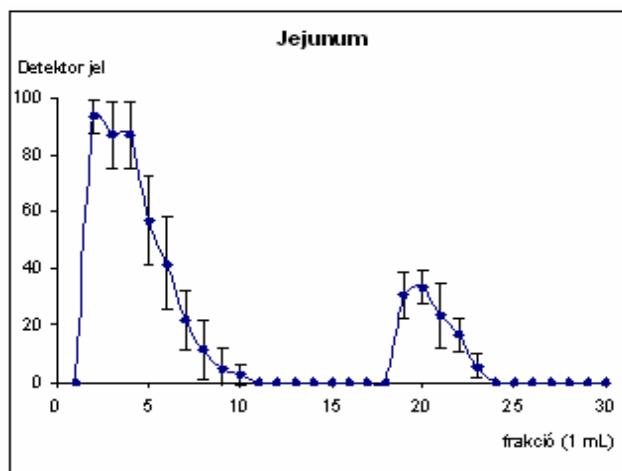
Kötőfehérje kivonás módszere

Felnőtt tojótújúkokat *lege artis* extermináltunk. A vékonybelet és májat kiemeltük. A *duodenum* és *jejunum* szakaszokat izotóniás sóoldattal (0,85 % NaCl, 4°C) átmostuk, majd a hosszában felvágott bélszakaszról a nyálkahártyát üveglemezzel lekapartuk. A szövetet, súlyának lemérése után 10 ml izotóniás sóoldatban homogenizáltuk. A centrifugálással (2500 RPM, 4°C, 10-15 min) nyert felülúszóból a fehérjéket ammónium-szulfáttal kicsaptuk (ad 50% w/w, éjszakán át, 4°C). A centrifugálással nyert precipitátumot elúciós TAB pufferban felvettük és éjszakán át csapvízzel szemben dializáltuk. A dializátumból 2,5 ml-t affinitás oszlopba töltöttünk, amit lezárva lassan forgó keverőn éjszakán át rázattunk. Az oszlopot kromatográfiás elrendezéshez csatlakoztattuk (*Uvicord* detektor: 280 nm; *MicroPerpex* perisztaltikus pumpa: 1 ml/min *RediRack* frakciószedő, 1 ml-es frakció; rekorder 1 cm/min) és elvégeztük az elúciót. Először TAB pufferrel leoldottuk a nem kötődött fehérjéket, aminek végét az jelezte, hogy a rekorder írója ismét visszatért az alapvonalra. További 10 min mosást követően az elúciót 6 M guanidin-HCl tartalmú TAB-pufferrel folytattuk. Az ezt követően eluálódó frakciót összegyűjtöttük, egyesítettük és mélyhűtve tároltuk további analízis céljára.

Ugyanezt az eljárást alkalmaztuk a májszövetből készített homogenátum esetében is.

Eredmények

Mindhárom szövet esetében az elúciós (TAB) pufferral nagy optikai denzitású, nagy mennyiségű, az affinitás mátrixhoz nem kötődött fehérje volt leoldható. Azt követően a további többszöri ágyvolument jelentő TAB-pufferes elúció során az OD-értékek az alapvonalon maradtak. A guanidin-HCl-TAB pufferrel történő további elúció hatására ismét OD növekedést tapasztaltunk. Ez azt jelezte, hogy a mátrixhoz kapcsolt ligandumon (BC) kötött fehérjék voltak, amelyek azért eluálódtak, mivel a nagy molaritású puffer hatására bekövetkező térszerkezeti változások a további kötődést nem tették lehetővé. Jellegzetes kromatogramot mutat be az *Affi ábra*. Az összegyűjtött frakciók jellemzése folyamatban van.



Affi ábra.

Háztyúk jejunum bélszakaszából készített fehérje kivonat affinitáskromatográfiája β -karotin-Pharmalink oszlopon

Elúció: TAB puffer 0-17. frakcióig (AUF 0,5); 17.-30. frakcióig Gu-HCl-TAB puffer (AUF 0,2)

Egyes természetes karotinoidok tyúkfélékben lejátszódó metabolizmusa területén végzett vizsgálatainkból levont következtetések

A felszívódás területén

- Napos csibék esetében a karotinoid felszívódás szinte kizárólag a szikzacskóból történik, mivel annak tartalma a szikbéljáraton át ürülő tartalom és a bélszakasz

retroperisztaltikája akár a duodenumig is tamponálja a bél lumenét, ezzel lehetetlenné teszi a p.os felvett karotinoidok felszívódását.

- Ezt az bizonyítja, hogy a szik karotinoidjai közül értelemszerűen hiányzó LY p.os adása esetén sem jelent meg a vér karotinoid frakciójában.
- Felnőtt (tojó) tyúkok esetében három vizsgált karotinoid (LY, BC, LU) esetében, mind az egyedi, mind keverékként történő adagolásukat követően az adott karotinoid szignifikáns mértékű megemelkedése jelezte a felszívódás tényét.
- Az adott karotinoid koncentrációemelkedésének mértéke valószínűsíthetően összefüggésben van a molekulák eltérő szerkezetéből (polaritásából, azaz oldékonyságából) következő portomikronba történő beépülés arányával.
- Az apoláros LY és BC csúcsai már a 6., az oxo-karotinoid (LU) a 12. órában adott maximum értéket.
- A BC és LU értékei a maximumuk után fokozatosan visszatértek a kiindulási szintre, ezzel szemben a LY esetében kisebb mértékű növekedést tapasztaltunk, ami viszont elnyújtva jelentkezett.
- A kombinált adagolások esetében úgy tapasztaltuk, hogy az apoláros karotinoid (LY) rontja a két oxo-karotinoid (LU, ZX) hasznosulását.

Az egyes karotinoidok színező hatásának területén

Japán fürjekkel végzett modell kísérleteinkből megállapíthattuk, hogy

- a takarmányba kevert likopin felszívódik és bekerül a tojómadár karotinoid metabolizmusába;
- a LY deponálódik a tojóasságájába és növeli annak színintenzitását;
- de a metabolizmus során nem fejt ki provitamin hatást;
- a vér triglicerid és koleszterin szintjének csökkenése sejteti, hogy a LY kölcsönhatásba lép a lipidmetabolizmus egyes tényezőivel is;
- a LY antioxidáns hatása – vasredukációs képesség mérésével (FRAP) nem, de TBARS módszerrel igazolható volt.
- Az eredmények mind az állati eredetű élelmiszerek minősége, mind táplálkozástudományi nézőpontból figyelmet érdemelnek.

Az objektív színmérés területén

- A direkt műszeres színmérés egyéb módszerekkel (fotometria, HPLC, YCF) összehasonlítva jó eredményt ad a tojások oxikarotinoid (LU+ZX) tartalmáról.
- Az említett módszerek közül a fotometria és a HPLC vegyszer és műszer igényével szemben mutat előnyöket.
- A YCF színminősítésének egyszerűsége ellenére a vizsgáló szubjektivitása és a fáradás ott hátrányt jelent.

A karotinoid kötő fehérje területén

- Házityúk vékonybeléből (duodenum, jejunum) és májából sikerült kimutatnunk egy BC-kötő fehérje frakciót. Ilyen fehérjét – ismereteink szerint eddig csak görény májából mutattak ki (Rao, és mtsai, 1997). Az általuk *cellular carotenoid binding proteinnek* (CCBP) nevezett fehérje feltételezhetően a karotinoidok sejtszintű metabolizmusában, mint a molekulát védő, az adott helyre juttató és a metabolikus változások végbemeneteléhez szükséges faktor szerepel.
- Saját vizsgálataink ezt alátámasztják, és a bélnyálkahártyából történő kimutatással a CCBP abszorpcióban betöltött szerepét is feltételezik.
- A további jellemzés érdekében, egyéb, különösen a madarak anyagcseréjében jelentős oxo-karotinoidokra vonatkozó vizsgálatokat tervezünk.