

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KAPOSVÁRI EGYETEM
ÁLLATTUDOMÁNYI KAR
Sertés és Kisállattenyésztési Tanszék
Állatitermék – minősítő Laboratórium

Doktori iskola vezetője:
Dr. Horn Péter
az MTA r. tagja

Témavezető:
Dr. Romvári Róbert
az MTA doktora

Társtémavezető:
Dr. Bogenfűst Ferenc
a mg. tud. kandidátusa

A LIBAMÁJ FEJLŐDÉS KOMPLEX VIZSGÁLATA

Készítette:
LOCSMÁNDI LÁSZLÓ

KAPOSVÁR

2007

1. Kutatási előzmények, Célkitűzések

Az utóbbi években a víziszárnyastenyésztés gazdasági helyzetében, környezetében határozott változás mutatkozik. A legnagyobb felvevő piacon, Franciaországban folyamatosan nő a hízott kacsamáj termelése és e terméknek elfogadottsága a libamájjal szemben.

A hústermelésre szelektált fajták, hibridek mellett a tenyésztők olyan májtermelő hibrideket alakítottak ki, melyek jól tolerálják a nagyüzemi körülményeket is. Hazánk az előállítók között évek óta az első helyen áll évi 1800 tonnás termelésével, melynek 75-80 %-a exportra kerül. A sikeres tenyésztőmunka eredményeképpen a termelésbe vont hibrideknél az éves átlagos májtömeg növekedés 0,5 % körül alakult az utolsó tíz év eredményeit tekintve.

Lényegi változás, hogy az EU állatvédelmi szabályozása 2011-ig engedélyezi a kényszeretetéssel előállított libamáj forgalmazását, utána már csak az alternatív megoldások elfogadhatóak, melyek a hazai gyakorlat számára ma még teljesen ismeretlenek. Mindezek alapján keresni kell azon új módszereket, amelyek a termelő szempontjából rentábilis, a fogyasztó számára pedig megfelelő minőségű libamáj előállítását biztosítanak.

Dolgozatomban a libamájat komplex módon kezelve, többféle megközelítésben próbáltam elemezni. Ennek megfelelően az alábbiakban foglalmaztam meg kutatási céljaimat:

- *In vivo* komputer tomográf (CT) vizsgálati módszer adaptálása a májfejlődés nyomonkövetésére, valamint a pixelgyakorisági értékek PLS regresszióra alapozott feldolgozása, a zsírtartalom becslése érdekében.
- A töméses májhizlalás jellemzése egyes vérparaméterek és máj szövettani képe alapján.
- Közeli infravörös spektroszkópiára (NIRS) alapozott gyorsvizsgálati módszer fejlesztése a máj, mint termék minősítésére.

2. Anyag és Módszer

Vizsgálatainkat 240 vegyes ivarú szürke landeszi liba bevonásával végeztük. Az intenzív tartási technológiával nevelt madaraknál a tömést megelőző nevelési szakaszt két részre osztottuk fel, úgymint felnevelési (0-6. hét) és előkészítési (pregavage) (6-14. hét) szakaszra. A nevelést követően az ivartól független, 4,2 kg-os testsúlyt meghaladó madarak tömőhöz kerültek kihelyezésre.

A felnevelés első négy hetében kereskedelemben kapható lúd indítótápot, majd az utolsó két héten lúd nevelőtápot kaptak a madarak. A töméselőkészítés időre korlátozott és ún. felszabadítási (*ad libitum* takarmányozás) szakaszában a madarak lúd nevelőtápot kaptak. Kivétel ezalól egy eset, mikor az utóbb említett szakaszban a nevelőtápot lúd tömőtáp váltotta fel. A madarakat vízfelvételükben nem korlátoztuk.

A töméses hizlalás során a tömő által elkészített párolt, szemes kukoricát ették az állatok. A hagyományos tömés 18, illetve 21 napig tartott úgy, hogy az első két napon napi négyszer, majd a tömés befejezéséig napi hatszor tömték a madarakat. A csökkentett tömésszámú technológiánál, mely 18 napig tartott, napi háromszor került sor a kényszeretetésre a kezelés teljes idejében.

2.1. Kísérleti beállítások

2.1.1. A májbeépülés metodikai célú CT vizsgálata

A pregavage technológiája a 15. élethétig tartott. A 18. és 20. hét közötti ún. visszafogyasztási szakaszban az állatok csak vizet vettek fel, takarmányt nem, annak ellenére, hogy az *ad libitum* állt rendelkezésükre. Az első öt időpontban mindhárom egyedről készültek ismételt CT felvételek. Húsz hetes életkorban csak két madarat vizsgáltunk (2.1.).

Egyedszám	3
Vizsgálati időpontok	nevelés alatt: 11., 15., tömés alatt: 16., 17., 18., visszafogyasztás alatt: 20. hét utolsó napja
Minták	máj
Vizsgálat típusa	májszövet beépülés nyomkövetése CT felvételekkel, 3D rekonstrukció

2.1.2. A máj zsírtartalmának CT alapú becslése

Az ismételt CT felvételezések során a vizsgált mintaszám alkalmanként nyolc egyeddel csökkent, azok próbavágása miatt (3.2.).

Egyedszám	32
Vizsgálati időpontok	nevelés alatt: 14., tömés alatt: 15., 17., visszafogyasztás alatt: 19. hét
Minták	máj
Vizsgálat típusa	máj zsírtartalmának mérése kémiai úton és becslése CT felvételekkel

2.1.3. Töméselőkészítés hatásának vizsgálata

A vizsgálatban szereplő egyedekből 10 lúdnevelő tápot, 6 pedig tömőtápot kapott az előkészítés során. Ennek megfelelően azonos volt a takarmányozási technológia, de eltért a takarmány összetétel (3.3.).

Egyedszám	16
Vizsgálati időpontok	töméselőkészítés végén: 14. hét
Minták	máj, vér
Vizsgálat típusa	CT felvételek elemzése, kémiai összetétel meghatározása szérum metabolitok, enzimek vizsgálata

2.1.4. A töméses hizlalás vizsgálata

Ebben a vizsgálatban komplex közelítést alkalmaztunk, amennyiben öt különböző elven alapuló mérést végeztünk. Az *in vivo* CT felvételezés egyedszáma alkalmanként 6-tal csökkent a próbavágások következtében (3.4.).

Egyedszám	30
Vizsgálati időpontok	nevelés alatt: 6. hét, tömés alatt: 7., 11., 14., 18. nap
Minták	máj, vér
Vizsgálat típusa	CT felvételek, kémiai összetétel, membrán foszfolipid zsírsavösszetétel elemzése, szöveti képek, szérum metabolitok, enzimek vizsgálata

2.1.5. Ultrahangos vizsgálat

Többféle vizsgálófejet (2.7.1.) alkalmaztunk, annak érdekében, hogy a máj jobb lebenyének bordaívhez képest mért túlnyúlását meghatározzuk. Az UH mérés során a vágott madarakat vizsgálati állványra helyeztük a máj megfelelő pozícióba hozása érdekében (3.5.).

Egyedszám	35
Vizsgálati időpontok	tömés végén: 17. hét
Minták	máj
Vizsgálat típusa	májméreték, májtömeg meghatározása UH felvétellel

2.1.6. Hosszított tömésidejű májelőállítás vizsgálata

Az első vizsgálati időpontban 20, majd ezt követően alkalmanként 7 – 11 madarat próbavágtunk. A 19-22 nap közötti intervallum már túltömésnek tekinthető, amivel célunk ún. „zsírmáj” előállítás volt (3.6.).

Egyedszám	68
Vizsgálati időpontok	nevelés alatt: 14. hét, tömés alatt: 13., 18. nap, túltömés alatt: 19., 20., 21., 22. nap
Minták	máj, vér
Vizsgálat típusa	CT felvételek elemzése, kémiai összetétel meghatározása szérum metabolitok, enzimek analízise

2.1.7. A NIRS módszer alkalmazása a máj zsírsavösszetételének becslésében

A májakat a Merian Orosháza Rt-től vásároltuk, kifejezetten termékvizsgálat céljából. A májak üzemi minősítést követően érkeztek a laboratóriumba, 692 ± 168 g-os átlagsúlyban. A tömés 18 napig tartott, a nevelési és a takarmányozási feltételek a Magyarországon széleskörben elterjedt intenzív technológiának feleltek meg (3.7.).

Egyedszám	50
Vizsgálati időpontok	tömés alatt: 18. nap
Minták	máj
Vizsgálat típusa	NIR spektrumok felvétele (nyers minta), kémiai összetétel és zsírsavösszetétel meghatározása

2.2. Alkalmazott vizsgálati módszerek

2.2.1. Ultrahangos vizsgálat

A máj két fő lebenye a növekedés során eltérő alakja miatt különböző időpontban látható az UH számára. A jobb lebeny nő túl elsőnek a vizsgálatot nehezítő bordákon. Ennek kinyúló hosszát ANISCAN típusú ultrahang berendezéssel vizsgáltuk, öt fejtípust kipróbálva (3,5 MHz convex, 3,5 MHz lineáris, 5 MHz lineáris, 7,5 MHz lineáris, 10 MHz lineáris). Az

UH felvételezést telepi körülmények között végeztük, az erre a célra általunk kifejlesztett vizsgáló tartóállványon, anaesthetikumok alkalmazása nélkül rögzítve az állatokat.

2.2.2. Komputer Tomográfias (CT) felvételezés és képfeldolgozás

A libák *in vivo* CT felvételezését a Kaposvári Egyetem Diagnosztikai és Onkoradiológiai Intézetében végeztük el Siemens Somatom Plus S40 spirál CT alkalmazásával. Egyedenkénti mérlegelést követően a vizsgálat alatt a madarakat speciális tartóeszközökben, hevederek segítségével, hátrafelé nyújtott lábakkal, anaesthetikumok alkalmazása nélkül rögzítettük. A libák eltérő mérete miatt egyedenként 8-30, egyenként 10 mm-es szeletvastagságú felvétel készült teljes átfedéssel, azaz 10 mm-es lépésközzel, lefedve a teljes májrégiót. A 3D felvételek készítéséhez 5 mm-es szeletvastagsággal és 5mm-es lépésközzel dolgoztunk. A felvételeket intézeti fejlesztésű posztprocesszáló programokkal elemeztük.

2.2.3. NIRS vizsgálat

A homogenizálást követően (IKA A11 basic malom) a májakról nyers állapotban vettünk fel közeli infravörös spektrumokat FOSS NIRSystems 6500 berendezéssel (Foss NIRSystems INC., Silver Spring, MD, USA). Ennek során reflexiós spektrumok felvétele történt az 1100-2500 nm-es hullámhossz tartományban, 2 nm-es lépésközzel a WinISI II v1.50 vezérlő szoftver segítségével. A mérések során Sample Transport Module mintakezelő egységet és ún. Small Ring Cup mintatartót használtunk "Full" módban a homogenizátum vizsgálatára.

2.2.4. A májminták kémiai összetételének vizsgálata

A zsírtartalom vizsgálat a MSZ 6830-6:1984, a fehérjetartalom meghatározás a MSZ 6830-4:1981 szerint történt, míg a nedvességtartalmat a MSZ ISO 1442-ben rögzítettek alapján mérték.

2.2.5. Zsírsvösszetétel meghatározás

A májminták mechanikai előkészítését, majd a lipidek kioldását minden esetben *Folch és mtsai. (1957)* módszerével végeztük, a zsírsvak mérését

pedig metilészterekké való átalakítás és gázkromatográfiás elválasztás után lángionizációs detektor segítségével történt (MSZ EN ISO 5508-1992).

2.2.6. Klinikai kémiai analízis

A különböző szérum metabolit koncentrációkat és enzim aktivitás értékeket Konelab 20i automata analizátorral határozták meg előírt reagensekkel adott mérési hullámhosszokon

2.2.7. Szövetteni feldolgozás

Az 5 μ vastagságú parafinba ágyazott metszeteket ezüst-nitrát (AgNO₃) és haematoxin-eosin módszerrel festették meg. A haematoxin-eosin módszerrel a májsejtek zsírral való telítődése követhető nyomon, míg az ezüst-nitrátos festési módszer a sejtek membrán vizsgálatára ad lehetőséget. A metszeteket leíró analízissel jellemeztük, mely során az elzsírosodás mértéke, jellege (kiscseppes vagy nagycseppes formát ölt-e), a májsejtek %-os érintettsége, a lobosodás mértéke mellett a sejtmembrán épségének vizsgálatára fektettük a fő hangsúlyt.

2.3. Adatfeldolgozás és statisztikai analízis

A kémiai analízis eredményei, valamint a CT adatok közötti korreláció számításokat Pearson szerint végeztük. A regressziós vizsgálatokban lineáris és S-görbére alapozott közelítést alkalmaztunk. A kísérletekben alkalmazott varianciaanalízisek elvégzése után a csoportok közötti eltérések szignifikanciáját Tukey–teszt segítségével vizsgáltuk. A biometria számítások elvégzésére az SPSS 10.-es szoftvert (SPSS Inc., 1999) használtuk.

2.3.1. A pixelgyakorisági értékek feldolgozása

A májösszetétel-becslésére szolgáló egyenleteket PLS regresszióval készítettük, röntgensugár gyakorisági értékek alapján. A szöveti eloszlást vizsgáló háromdimenziós hisztogramok szerkesztése a negatív exponenciális interpoláció módszerével történt. A háromdimenziós hisztogramok szerkesztését a SYSTAT 5.01-es szoftver (SYSTAT, 1990), NEXPO (Negative Exponential Interpolation) algoritmusának segítségével, valamint a

TableCurve (1998) 3D szoftverrel végeztük, a felület simítására NURBS (Nonuniform Rational B-Splines) módszert alkalmazva.

2.3.2. NIR spektrumok analízise

A spektrumanalízist a WINISI II version 1.5 (2001, InfraSoft International, Port Matilda, PA, USA) spektrum értékelő szoftverrel végeztük. A spektrumok és a referencia tulajdonságok (zsír-, fehérje-, szárazanyagtartalom) kapcsolatát a részleges legkisebb négyzetek módszerének módosított változatával mPLS (modified Partial Least Squares) elemeztük. A kalibrációt a teljes spektrum második deriváltjára alapoztuk. Négyes „gap” (rés) és „smooth” (simítás) értékeket használtunk (ez a „hagyományos WinISI formátumban”: 2,4,4-nek felel meg), standard MSC (normál multiplikatív szórás korrekció) alkalmazásával. A kalibráció tesztelésére „leave-one-out” kereszt validációt alkalmaztunk. Az mPLS modell optimalizálása során minden konstituens összetevő esetében azt a faktort vettük figyelembe, ahol a legkisebb volt a validáció standard hibája (SECV).

3. Eredmények

3.1. A májbeépülés metodikai célú CT vizsgálata

A metodikai célú *in vivo* spirál CT vizsgálatok eredményeképpen leírtuk a máj térfogat, felszín, valamint az átlagos röntgensugár elnyelődési értékeinek változását a töméses hizlalás, majd az azt követő regenerációs időszak (visszafogyasztás) során. Az alkalmazott felvételezési technikának köszönhetően 3D rekonstrukciók segítségével is bemutattuk a máj geometriai viszonyának alakulását. Az eredmények szerint a 11 hetesen és a tömés kezdetekor mért térfogat és felszín értékek nagyon hasonlóak voltak. A korai gyors növekedés után a tömés 21. napjára, azaz annak végére a máj térfogata megötszöröződött (150 cm^3 vs. 800 cm^3). Két héttel a tömés befejezése után, mely időszak alatt a madarak *ad libitum* takarmányellátás mellett sem vettek fel takarmányt, csak vizet, a máj térfogata ismét elérte a kiindulási értéket. A mért denzitásértékek (HU) is érzékenyen és reverzibilisen követték a tömés alatti változásokat (+80 HU-ról lecsökkent -55 HU-ra, majd a visszafogyasztás végére elérte a +55 HU értéket).

3.2. A máj zsírtartalmának CT alapú becslése

A pixeldenzitások gyakoriságértékei alapján eltérő módszerekkel becsültük a máj zsírtartalmát. Először az átlagos-, a legnagyobb gyakorisággal előforduló HU érték, majd a számított HU index (ún. zsírindex) és a kémiaileg meghatározott zsírtartalom között számítottunk korrelációt. A zsírtartalom becslése szempontjából a CT-vel mért paraméterek közül a legszorosabb összefüggést a legnagyobb gyakorisággal előforduló HU érték adta. A továbbiakban többváltozós lineáris regressziós egyenleteket fejlesztettünk a kémiai analízissel meghatározott zsírtartalom becslésére, független változóként a mért, illetve számított CT paraméterek bevonásával ($R^2=0,80$).

3.3. Töméselőkészítés hatásának vizsgálata

Modell vizsgálat során az ún. töméselőkészítés („pregavage”) módszerét alkalmaztuk. Mivel a technológia és az alkalmazott fajta azonos volt, így a tömőtáp és a lúd nevelőtáp májra kifejtett hatását tudtam összehasonlítani. Eredményeim szerint szignifikáns eltérést kaptam amájtömeg, májtérfogat, szárazanyagtartalom, 100 g szárazanyagra vonatkoztatott zsír- és fehérjetartalom vonatkozásában. A vérvételt követően statisztikailag igazolható különbséget találtunk az albumin a triglicerid az összbilirubin és a húgysav, valamint a főbb májenzimek, az LDH, GGT és az amiláz esetében. Mind a mért metabolitok, mind pedig az enzimek fokozott intenzitású anyagcserére utalnak, jelezve a tömőtáppal történő előkészítés hatékonyságát. Ez ugyanakkor önmagában még nem jelenti a technológia alkalmasságát töméses hizlalás nélküli tömött máj előállítására, azonban felhívja a figyelmet arra, hogy ez a módszer befolyásolni tudta a máj méretét és annak zsírtartalmát.

3.4. A töméses hizlalás vizsgálata

Újszerű módon a vizsgálati időpontokban vett szövetmintákat hisztológiai módszerekkel tipizáltuk a citoplazma mikro- és makrovezikuláris elzsírosodása alapján. Ezzel párhuzamosan a kényszeretett ludak metabolikus státuszának szérumban paraméterekkel történő jellemzésekor a szérumban triglicerid, a HDL és az összkoleszterin szint emelkedését tapasztaltuk. Az aszparaginsav-aminotranszferáz (AST) és alanin-

aminotranszferáz (ALT) aktivitás is nőtt, ugyanakkor ezen intracelluláris enzimek egyike sem jelzett máj működési zavart, vagy sejtmembrán sérülést. A szövettani kép és a szérum paraméterek együttes értékelését is elvégeztük, a sejtmembrán foszfolipid minőségi tulajdonságainak figyelembe vételével. Érdekes módon a tömés befejező szakaszában sem mutattunk ki jelentős sejtkárosodást, ami a szürke landeszi lúd jó technológiai tűrőképességét bizonyítja.

Kísérletünkben a tömési periódus 18 napig tartott, aminek során a máj zsírtartalma folyamatosan emelkedett, végül meghaladta az 50 %-ot. Ezzel ellentétesen alakult a máj fehérjetartalma. A zsírtartalom vonatkozásában a folyamatot a denzitásértékek alapján szerkesztett 3D hisztogramok segítségével is számszerűsítettük.

A máj zsírtelítődésének kapcsán bizonyos szöveti, sejtes elváltozásokra és sérülésekre is gondolnunk kell. Ennek megfelelően a szövettani képek értékelése során először tipizáltuk a rendelkezésre álló, a tömés 18. napjáról származó mintákat a különböző fokú elzsírosodás alapján. Az elzsírosodás mértéke érdekes módon annak térbeli szerveződését is befolyásolta. Jellemzően a steatosis a következő lépéseknek megfelelően alakult ki: mikro-, majd makrovezikuláris lipid-állapot, végül pedig a makrovezikuláris szerkezet léziójából fakadó cisztás zsírosodás volt megfigyelhető. A metszetek értékelése alapján a technológiai szempontból fontosnak tekintett sejtruptúrát ugyanakkor nem tudtam igazolni.

A szérum paraméterek vizsgálatokor arra törekedtünk, hogy jellemezzük a madarak metabolikus státuszát a kényszeretetés során, együttesen értékelve az előzőekben bemutatott szövettani képpel. Amíg az összfehérje (55.8 – 64.7 [g/L]) és az albumin (21.0 - 19.5 [g/L]) koncentrációja nem változott szignifikánsan. a kezelés során, addig a szérum húgysav koncentrációja (szorosan összefüggve az etetett takarmány fehérjetartalmával) erősen megnövekedett a töméses hizlalás végére. A tömés során etetett, nagy szénhidrátartalmú kukorica emésztéséért felelős amiláz aktivitásának értéke 2400 és 3000 IU/L között változott, a normál élettani határokon belül.

Ezek után a szövettanilag feldolgozott mintákat a metszeteken látható elzsírosodás mértéke szerint két kategóriára osztottam. A két csoport esetében a májak súlya, valamint zsírtartalma határozottan elkülönült. A szérum paramétereket elemezve azt tapasztaltam, hogy a szérum ALT

aktivitása szoros kapcsolatban áll a fenti kategóriákkal. Valószínűsíthető, hogy az intenzív elzsírosodás folyamata mellett számolni kell bizonyos mértékű sejt károsodással, amely mérhető ugyan, de élettani szempontból még semmiképp nem tekinthető kritikusnak.

Vizsgáltuk a sejtmembrán foszfolipid minőségi tulajdonságait (zsírsavprofil) is a két csoport vonatkozásában. A szövettani képeken tapasztalt, esetenként meglehetősen előrehaladott elzsírosodás kapcsán azt feltételeztük, hogy a sejtbeli triglicerid akkumuláció valószínűleg sejtkárosodáshoz is vezet. Érdekes módon a májszövet foszfolipid frakciójának zsírsavprofiljában csak egy zsírsav (C18:0) esetében tapasztaltunk eltérést a szövettani alapon létrehozott elzsírosodási kategóriák között. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy amennyiben számolnunk kell sejtkárosodással, az nagy valószínűséggel nem a lipid, hanem a membrán-fehérjék szintjén következik be, a máj ilyen intenzitású igénybevételekor.

A vizsgálat eredményeit összefoglalva megállapítható, hogy a májsejt foszfolipidek minőségi elemzése, valamint az ezen időpontban vett vérminták alapján a késői tömés szakaszában sem történik jelentős sejtkárosodás, azaz kísérletünkben a máj jól megtartott szerkezetű, technológiai szempontból kiváló minőségű volt

3.5. Ultrahangos vizsgálat

A CT felvételezés mellett ultrahangos vizsgálatokat is végeztünk, üzemi körülmények között is alkalmazható gyorsvizsgálati módszer kidolgozása céljából, felhasználva azt a jelenséget, hogy a ludak májelzsírosodása folyamán a jobb oldali lebeny hamarabb nyúlik túl a bordaíven, mint a szív alakú bal. Ez a *caudális* túlnyúlás lehetővé teszi az UH számára annak érzékelését, így a rész hosszának mérését. Próbamérések során kidolgoztuk a máj vizsgálati technikáját, beleértve az ultrahangos vizsgálófej és az alkalmazott frekvencia kiválasztását, valamint a madarak megfelelő pozicionálásának céljára tartót fejlesztettünk ki.

Az UH metodika tesztelése céljából elvégzett *in vivo* vizsgálatot követő próbavágás adatai alapján becsültük a túlnyúlás mértékét ($R^2 = 0,9$), ezt követően pedig a májtömeget ($R^2 = 0,86$). Az előzetes eredmények alapján, a

módszert alkalmasnak tartjuk az állomány kategorizálására a tömés előkészítő szakaszának végén.

3.6. Hosszított tömésidejű májelőállítás vizsgálata

A szérum paraméterek változását elemezve azt találtuk, hogy az összkoleszterin, mintegy indikátora a többi szérum jellemzőnek, amennyiben emelkedése magasabb összfehérje, triglicerid, húgysav, LDH és GGT értékkel társul. Az egyedek szintjén vizsgálva megállapítható, hogy azon madarak, melyek magasabb metabolikus és enzimikus értékkel bírtak, nem mutattak az átlagostól eltérő májtömeg értéket, ugyanakkor átlag alatti zsírtartalommal voltak jellemezhetőek. Feltételezhető, hogy a feltűnően magas szérumlipid tartalmú libák, valószínűleg nem reagálnak megfelelően a töméses hizlalásra. Ezzel párhuzamosan a máj lipidtároló-képessége is alacsonyabb és ebben az esetben a vér lipidforgalma megnő. Érdekes módon sem a májtömegben, sem a kémiai összetételben, sem pedig a szérum paraméterekben nem találtam igazolható eltérést a túltömés időszakában, amennyiben a tömés 19. és 22. napját hasonlítottam össze. Ennek alapján feltételezhető, hogy további napok szükségesek ennek az állapotnak az eléréséhez.

A máj zsírtartalma a tömés 18. napja után (350-400 g-os májtömeg felett) már nem emelkedett, egyfajta telítődési folyamat volt megfigyelhető. A májtömeg és a kémiailag meghatározott zsírtartalom összefüggésének vizsgálatokor a legjobb közelítést ($R^2 = 0,91$) az "S" görbe alkalmazása esetén értük el. Az *in vivo* vizsgálatok során meghatározott pixel gyakorisági eloszlások alapján, PLS regresszió segítségével a máj fehérje- és zsírtartalmára vonatkozó kalibrációs egyenletek R^2 értéke mindkét összetevő esetében meghaladta a 0,97-et.

A szérum vizsgálatok során, a metabolikus státusz leírásán túl kapcsolatokat kerestünk az *in vivo* módon becsült májszövet jellemzők és a vérszérum paraméterek között. A vér lipidek és a máj CT-vel becsült zsírtartalma között $r=0,68$, $0,79$ és $0,82$ korrelációt kaptam a triglicerid, az össz- és a HDL koleszterin sorrendjében. A szérum koleszterin koncentrációja viszonylag magas volt, tekintettel a madarak töméses hizlalására, illetve a magas zsírbevitelre. Mikor a ludakat ennek alapján vizsgálati naponként csoportosítottam (18., 19., 20., 21. és 22. tömési nap), a magasabb

összkoleszterin értékhez az átlagnál minden esetben magasabb összfehérje, triglicerid, húgysav, és összbilirubin koncentráció tartozott. Ehhez hasonlóan az LDH és a GGT aktivitások is jóval magasabbak voltak a csoportátlagoknál. Az össz- és a HDL koleszterin koncentrációja között erős korrelációs összefüggést találtam ($r=0,90$).

A enzimatikus adaptáció vizsgálata érdekes eredményeket hozott. A szérumban jelenlevő intracelluláris enzimek közül az ALT és az AST erősen megemelkedett aktivitása jelezhet máj működési zavart, vagy esetleges sejtmembrán sérülést. A tömést 22. napig folytatva azonban nem mutatkozott további változás az aktivitás értékekben. Mindkét enzim esetében azt tapasztaltam, hogy a tömött madarak csoportjában az átlagérték jelentősebb növekedése mellett a szórás is erősen megnőtt. A kísérlet alatt az ALT aktivitása a kétszeresére, az AST aktivitása a négyszeresére növekedett. Kisebb növekedés volt tapasztalható az LDH esetében, míg a GGT változása nem volt szisztematikus a tömés során. Eredményeim arra utalnak, hogy egyes madarak nagyobb „hepatikus érzékenységet” vagy kisebb „terhelhetőséget” mutatnak e tekintetben. Valószínű, hogy itt a májba történő TG depozíció is kisebb mértékű. Érdekes, hogy a humán diagnosztikában a hepatopathia indikátoraként alkalmazott GGT esetünkben nem volt informatív mutató, ugyanakkor valószínűsítjük, hogy ezen enzim aktivitása a töméses hizlalás végső, igen intenzív zsírfelhalmozódással jellemezhető fázisában fokozódik jelentősen.

3.7. A NIRS módszer alkalmazása a máj zsírsavösszetételének beclésében

A hizott libamáj, mint termék vonatkozásában üzemi minősítés során kategorizált mintákat vizsgáltunk NIRS módszertannal és gázkromatográfias analízissel. A többszörösen telítetlen/telített zsírsav arány a tömött májban (1,36) messze meghaladja az állati eredetű élelmiszerekre vonatkozó ajánlásokat (0,45). Ez igaz volt az n6/n3 arányra is, ami a májban 10 körül alakult, szemben a humán táplálkozás egészségügyi szempontból ajánlott 3-4-es értékkel. A telítetlenségi index (60,8) megítélése kettős: egészséges táplálkozás szemszögéből a mért érték meglehetősen alacsony, tárolhatóság szempontjából viszont előnyös, miután oxidációval szembeni alacsony érzékenységre utal.

A zsírtartalom becslésén kívül ($R^2=0,81$), a nyers, homogenizált májmintákon alapuló gyorsvizsgálati eljárás sikeresnek bizonyult a két legmagasabb arányban jelenlévő zsírsav, az olajsav ($R^2=0,94$) és a palmitinsav ($R^2=0,93$) esetében is. A sztearinsavat (C18:0), mely 15,5% arányban fordult elő, már nem tudtuk becsülni. Hasonló módon jól becsülhetőnek bizonyult a májlipidek relatíve magas oxidatív stabilitását bizonyító UI érték is ($R^2=0,79$).

4. Javaslatok

A hizott libamájelőállítással kapcsolatban az állatvédők részéről korábban megfogalmazott kritikák a jogszabályi háttér változását, így az EU tiltó határozat 2011-től esedékes hatályba lépését fogják eredményezni. Ebből a szempontból lényegesnek tartom azokat a technológiai fejlesztéseket, melyek a tömés nélküli májelőállításra koncentrálnak.

Saját vizsgálataim során, eltérő módszerekre támaszkodva új adatokkal szolgáltam a máj térfogatos növekedésével és elzsírosodásával kapcsolatban, keresve azon összefüggéseket, melyek elősegíthetik új alternatív technológiák kidolgozását. Hangsúlyozni kívánom ugyanakkor az általam alkalmazott nem invazív mérési eljárások (CT, UH) előnyeit, amennyiben ezek harmonizálnak az egyre szigorodó állatvédelmi előírásokkal. Ennek megfelelően az ilyen elvű vizsgálatok könnyen engedélyeztethetők, ismételhetők és azok eredményei széles körben publikálhatók.

A hizott libamáj piaci megítélésének alapja annak mérete, illetve zsírtartalma. A korábbi kaposvári CT vizsgálatok során eltérő gazdasági haszonállatok teljestestének kémiai összetételét határozták meg. Saját vizsgálataimban a korábbi eredményeket adaptálva eltérő módszereket alkalmaztam a máj zsír- és fehérjetartalmának becslésében. A hizott libamáj, mint extrém magas zsírtartalmú termék igen jól jellemezhetőnek bizonyult a pixeldenzitások gyakorisági eloszlásából származtatott változók alapján. Mivel adott időpontban a máj szöveti állománya közel homogének tekinthető, akár néhány felvétel alapján is becsülhető annak összetétele.

A más állatfajokon végzett vizsgálatokhoz hasonlóan a lúd faj esetében is kihasználtuk az *in vivo* CT vizsgálatok azon lehetőségét, mely ugyanazon egyedek ismételt felvételezésén alapul. A módszer biztosította a máj beépülésének követését a teljes töméses hizlalás során.

A nem invazív CT képalkotó technika alapjául szolgálhat egy, a májhozam növekedését célzó szelekciós eljárásnak, mely a közeljövőben a hízott máj előállítását célzó szigorú megszorítások miatt a tömés nélküli májtermelésre alkalmas egyedek kiválasztásánál kaphat szerepet. Az úgynevezett „pregavage” módszer azon piaci megfontolásból kerül/került kifejlesztésre, hogy olyan országok számára is elő lehessen állítani nagy zsírtartalmú, a töméses eljárással előállított termékkel közel azonos minőségű libamájat, ahol a töméses hizlalással előállított máj forgalmazása tiltott. A CT alkalmazásával a ludak az előkészítő szakasz végén vizsgálhatók a megfelelő méretű, az adott piacon értékesíthető májat produkáló egyedek levágásra, míg a többi állat hagyományos töméses hizlalásra, illetve 2011 után kommersz terméként értékesítésre kerülhet.

A keresztmetszeti felvételek szekvenálásán alapuló 3D rekonstrukciók jól jellemzik a máj morfológiáját. A rendelkezésre álló képanyag lehetőséget biztosít egyfajta geometriai modell felállítására, ami eltérő liba genotípusok töméses hizlalás alatti májbeépülésének összehasonlíthatóságát biztosíthatná.

Megítélésem szerint az UH májtermelésben történő felhasználása elsősorban az alternatív módon tömött máj vizsgálatánál kaphat kiemelt szerepet. Eredményeim szerint egyfajta előszelekciós módszernek tekinthető, így a „pregavage”-ra jól reagáló egyedek kiemelésében kaphat szerepet. A bemutatott üzemi kísérlet során kipróbáltuk és bizonyítottuk a módszer technológiába történő beilleszthetőségét.

A töméses hizlalás komplex vizsgálata felhívta a figyelmet arra, hogy a túltömött máj kialakulásával kapcsolatos folyamatok modellezése hosszabb töméses periodust igényel. Bár saját vizsgálatainkban az egyes májak eredeti szárazanyag tartalomra vonatkoztatott zsírtartalma megközelítette a kritikusnak tekintett 55 %-os értéket, sem a szérum paraméterek, sem pedig a szövettani minták feldolgozása nem mutatta a májsejtek károsodását. Ennek alapján, figyelemmel az alkalmazott szürke landeszi fajta tűrőképességére, további, hosszabb tömési perióduson alapuló vizsgálatok javasolhatók. Meg kell azonban jegyezni, hogy a korábban említett jogszabályi változások

miatt, legalábbis Európában a várható eredmények gyakorlati felhasználhatósága alacsony.

Miután a hisztológiai módszerekkel előrehaladottan elzsírosodott májakban sem találtunk membránszintű elváltozást a foszfolipid frakció zsírsav összetételének gázkromatográfiás analízisével, további olyan vizsgálatokat tartok indokoltnak, melyek a membrán fehérjékre fókuszálnak.

Feldolgozóipari szempontból a vágóhídon jelentkező májminták kémiai összetételének, elsősorban zsirtartalmának ismerete alapvető fontosságú. Ennek megfelelően indokolt olyan gyorsvizsgálati módszer kialakítása, amely nagy baromfifeldolgozókbba telepítve on-line működésre is alkalmassá tehető. Erre a célra alkalmasnak tartom az oldószermentesen, így környezeti terhelés nélkül működő NIR metodikát, amely a hagyományos módszerekhez képest lényegesen alacsonyabb költségszinten alkalmazható nagy mintaszámú rutinvizsgálatok elvégzésére. Saját vizsgálataink eredményeképpen, továbbá a piacon megjelent hordozható NIR készülékek jellemzői alapján minden lehetőség adott az eljárás alkalmazására. Kísérleteink során a NIR módszer alkalmasnak bizonyult a telítetlenségi index mérésére a májban, ezen keresztül az oxidatív stabilitás, végső soron az eltarthatóság megítélésére, ami élelmiszertechnológiai szempontból tekinthető jelentősnek.

Hangsúlyozni szeretném, hogy a bemutatott módszertant alkalmasnak tartom a pézsmarécével és ennek a házikacsával alkotott fajhibridjével, a mularddal történő májelőállítás vizsgálatára is. Ebből a közelítésből eredményeim felhasználhatók az európai zsíros baromfimáj előállításában, melynek 95 %-a mulardkacsa használatán alapul. A májelőállítás nemzetközi trendjét figyelve ugyanakkor remélem, hogy vizsgálati eredményeim a Távol-Keleti kutatók érdeklődésére is számot tarthatnak.

5. Új tudományos eredmények

- *In vivo* spirál CT képalkotó eljárás alkalmazásával bizonyítottam a máj térfogat- és zsírtartalom változásának reverzibilitását a töméses hizlalást követő regenerációs fázisban.
- PLS regresszió alapuló módszert dolgoztam ki a pixelek röntgensugár gyakoriság eloszlási értékeinek felhasználásával a máj zsírtartalmának *in vivo* becslésére.
- Megállapítottam, hogy a töméses hizlalás során a szérum jelentősen emelkedett összkoleszterin szintje együtt jár a szérum LDH és GGT fokozott aktivitásával, a triglicerid, összfehérje és a húgysav emelkedett koncentrációjával a populáció átlagához képest alacsonyabb májtömegű egyedeknél.
- Megállapítottam, hogy a szövettani vizsgálat szerint enyhén és erősen elzsírosodott májak teljes zsírtartalmának frakcionált, zömében membrán eredetű foszfolidid tartalmának zsírsavprofilja egymástól nem tér el érdemben, utalva a sejt-integritásának megőrzésére.
- NIRS alapú gyorsvizsgálati eljárást dolgoztam ki a hízott libamáj kémiai összetételének becslésére.

6. A disszertáció témaköréből megjelent publikációk

6.1. Idegen nyelvű közlemények

Locsmándi, L., Romvári, R., Bogenfürst, F., Szabó, A., Molnár, M., Andrassy-Baka, G., Horn, P. (2005) *In vivo* studies on goose liver development by means of computer tomography. *Anim. Res.* 54. (2): 135–145. pp.

Locsmándi, L., Kövér, G., Bázár, G., Szabó, A., Romvári, R. (2006): Development of model using near-infrared reflectance spectroscopy for the determination of the chemical composition of fatty goose liver. *Acta Alim.*, 35. (4): 455-463. pp.

Locsmándi, L., Hegedüs, G., Andrásy-Baka, G., Bogenfürst, F., Romvári, R. (2007): Following the goose liver development by means of cross-sectional digital imaging, liver histology and blood biochemical parameters. *Acta Biol. Hung.*, 58. (1): 35-48. pp.

6.2. Magyar nyelvű szakfolyóiratban megjelent közlemények

Romvári, R., Andrásy, Zné., Petrási, Z., Locsmándi, L., Szabó, A., Horn, P. (2005): Képkalkotó eljárások alkalmazásának lehetősége a baromfitenyésztésben. *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 54 (5): 453-465. pp.

6.3. Proceedingekben teljes terjedelemben megjelent közlemények

Andrásy-Baka, G., Romvári, R., Bogenfürst, F., M. Molnár, Locsmándi, L. (2002): In vivo investigation of fatty goose liver by means of CT. *Animal Science Days 2002*, Pécs, október 17. *Acta Agr. Kaposváriensis Suppl.* pp.131-137.

Locsmándi, L., Bogenfürst, F., Molnár, M., Romvári, R. (2003): Képkalkotó eljárások a lúd májtermelő képességére végzett szelekcióban. *Proc. VI. Nemzetközi Baromfitenyésztési Szimpózium, Kaposvár*, 21-38. pp.

Locsmándi, L. (2004): Komputertomográf (CT) felhasználása a lúd májtermelő képességére végzett szelekcióban. *X. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely, (CD)*

Locsmándi, L., Bogenfürst, F., Hegedüs, G., Szabó, A., Molnár, M., Romvári, R. (2004): A libamáj elzsírosodásának komplex vizsgálata. *Proc. VII. Nemzetközi Baromfitenyésztési Szimpózium, Kaposvár*, 17-24. pp.

Locsmándi, L. (2005): A szürke landeszi liba májelzsírosodásának jellemzése. *XI. Ifjúsági Tudományos Fórum, Keszthely, (CD)*