

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**A HÁZITYÚK
TAKARMÁNYFELVÉTELÉNEK
SZABÁLYZÁSÁBAN RÉSZTVEVŐ GÉNEK
VIZSGÁLATA AD LIBITUM ÉS
KORLÁTOZOTT TAKARMÁNYOZÁS
ESETÉN**

Simon Ádám László
doktorjelölt

Témavezető: Dr. Czeglédi Levente
egyetemi docens



DEBRECENI EGYETEM
Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

Debrecen, 2018.

1 A DOKTORI ÉRTEKEZÉS ELŐZMÉNYEI ÉS CÉLKITŰZÉSEI

A takarmányfelvétel szabályozása fontos kutatási téma az állattenyésztésben, mivel a felvett takarmány mennyisége, emészthetősége és a fajta genetikai képességei együttesen határozzák meg az állatok teljesítményét. A takarmányfelvételt fizikai és kémiai tényezők szabályozzák, utóbbiak központja a központi idegrendszerben található hipotalamusz. Az Európai Unió csirkehústermelése 2016-ban elérte a 14,8 millió tonnát, ami a világ csirkehús-termelésének mintegy 12,6%-át képezi, ez mintegy 6,5 milliárd madarat jelent. Hústermelés céljából az uniós csirkehúságazat gyorsan növekvő ún. brojlercsirkéket (pecsenyecsirkéket) használ fel. Ezek a brojlercsirkék a célértéknek tekintett 2,2-2,5 kg-os élőtömeget kb. 35-40 napos korukban érik el. Ez a vágósúly az 50 évvel ezelőtti érték majd kétszerese. Az Európai Unió a világ második legnagyobb tojástermelője, 390 millió tojótyúkkal és 7,2 millió megtermelt tojással 2016-ban (internet 1). Az erős szelekció következtében kialakult gyors növekedésnek nemkívánatos hatásai is vannak, ilyen a vágott áru növekvő elzsírosodási tendenciája, a vázrendszer fejlődési zavara, a vízhaskór és keringési zavarok (hirtelen halál szindróma) gyakoribb előfordulása, valamint a csökkenő reprodukciós teljesítmény. Egyre nagyobb az érdeklődés az olyan molekuláris markerek iránt, amelyek szerepet játszhatnak a takarmányfelvétel javításában, és ebben meghatározóak lehetnek a hipotalamuszban kifejeződő egyes neuropeptideket kódoló gének polimorfizmusai, valamint a génkifejeződésben mutatkozó eltérések. Ezek számos esetben előnyös asszociációt mutatnak a gazdasági állatfajok értékmérő tulajdonságaival. A madarak esetén jelenleg még keveset tudunk arról, hogy a takarmánymegvonás milyen hatással van a táplálékfelvételt serkentő (orexigén) és gátló (anorexigén) központi és perifériás neuropeptidek génkifejeződésére, annak ellenére, hogy az intenzív hizlalásban alkalmazott takarmányfelvétel korlátozása hozzájárul a hatékony baromfihús előállításban. A fizikális megvonás egy másik, egyszerűbben kivitelezhető, de kevésbé kutatott változata során 24 órára teljes takarmánymegvonást (skip-a-day feeding) iktatnak be a nevelés starter és hizlalo szakaszában. A 24 órás takarmánymegvonás jó lehetőséget nyújtana ahhoz, hogy a potenciális étvágy szabályzó neuropeptideket kódoló gének kifejeződését vizsgálhassuk. A neuropeptidek olyan kisméretű fehérje szignalizációs molekulák, amik általában 50 vagy kevesebb aminosavból állnak. Funkciójukat tekintve a neuronok működésének összekapcsolásában szerepelnek. Részt

vesznek a fájdalomérzet, a jutalmazás, tanulás és a táplálékfelvétel összehangolásában (Boswell, 2005; Denbow, 1994). Emlősök esetén 95 neuropeptidet kódoló gént azonosítottak, amikből több mint száz neuropeptid jöhet létre. Házityúk esetén az ismert neuropeptidet kódoló gének száma 65 (Delfino és mtsai., 2010). A madarak esetén a takarmányfelvétel szabályozása eddig kevésbé kutatott terület, az emlősökhöz képest sokkal kevesebb információ áll rendelkezésünkre. A kutatásaim jelentősége, hogy bővítsem azokat az ismereteket, amik hozzájárulhatnak majd a házityúk takarmányfelvételt szabályzó komplex folyamatok megértéséhez, továbbá megismerjük az éhezés-újraetetés hatására történő élettani változások molekuláris biológiai hátterét.

A doktori munkám során a következő kérdések megválaszolását tűztem ki célul:

1. A 40%-os takarmánykorlátozás milyen hatással van néhány, házityúk esetén még nem vizsgált, takarmányfelvétel szabályzásában szerepet játszó gének (*GAL*, *GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*, *GLUT8*, *GLUT9*, *INSR*, *NMU*, *NMUR1*, *NMUR2*, *PAC1*, *PACAP*) kifejeződésére a hipotalamuszban, a mirigyes gyomorban és az éhbélben.
2. A 24 órás takarmánymegvonás, illetve a takarmánymegvonás, majd 2 órás újraetetés hogyan változtatja meg az MCH kifejeződését brojlércsirke esetén? Tíz referenciagén stabilitásának vizsgálata 24 órás takarmánymegvonás, illetve takarmánymegvonás, majd 2 órás újraetetés hatására. Az MCH gén kifejeződésének összehasonlítása különböző szövetek között.
3. Az említett gének kifejeződése hogyan változik a növekedéssel, a brojlércsirke hasüregi zsír mennyisége korrelál-e ezen gének szintjével a hipotalamuszban? A hasüregi zsír, a testtömeg és a hasüregi zsír mennyiségéről visszajelzést adó (adipozítás) szignálok (inzulin, glükóz) szintje hogyan korrelál az MCH hipotalamikus koncentrációjával.
4. A 24 órás takarmánymegvonás hatására bekövetkező éhbél bélbolyhok morfológiai változásaival párhuzamosan milyen proteomikai változások mutathatóak ki az éhbélmintákban.

2 A KUTATÁS MÓDSZEREI

2.1 A 40%-os takarmánykorlátozás hatása a tojótípusú házityúk takarmányfelvételt szabályzó peptidjeinek és receptorainak kifejeződésére

2.1.1 Állatok és a kísérleti beállítás, mintavétel

A kísérletet Tetra-SL tojóhibridekkel állítottam be. A 16 házityúk a kísérlet indulásakor 22 hetes korú volt. Az állatokat egyenként ketreces volierekbe osztottam, majd az egy hét adaptációs idő alatt minden nap mértem az egyedek takarmányfelvételét. Az adaptációs idő után két kísérleti csoportot hoztam létre. Az egyik az *ad libitum* csoport volt (8 egyed), ami korlátlan mennyiségben hozzáfért a takarmányhoz (tojó 1-es típus takarmány: 17,5% nyersfehérje, metabolizálható energia: 11,7 AME_n MJ/kg szárazanyag, 3,8% kalcium, 0,4% foszfor). A másik csoport, a napi takarmányfelvétel 40%-os korlátozásában (az adaptációs időszak alatt, egyedenként megállapított átlagos napi felvétel alapján) részesült 5 napon keresztül. A kísérlet alatt mindkét csoport korlátlanul fért hozzá az ivóvízhez. A takarmányfelvételt minden nap mértem. Az 5 nap elteltével az állatokat taglózással, majd kivéreztetéssel vágtam le.

A terminálásukat követően a madarakat dekapitáltam. A taréjtól kezdődően Y alakú bevágással a fejbőrt eltávolítottam a koponyáról. A koponyát feltártam, majd az agyat kimetszettem. A teljes hipotalamuszt agyatlasz segítségével izoláltam (Griffin és mtsai., 2001). Az izolálás a köztiagy a látóideg kereszteződés és a szemmozgató ideg által határolt területének merőleges bemetszésével történt. Ezzel párhuzamosan a hasüreget is feltártam a teljes mirigyes gyomrot kimetszettem és 1 cm-es darabot izoláltam annak középső harmadából. A Meckel divertikulumtól kezdődően proximálisan 1 cm-es darabot kimetszettem az éhbélből. A két szervből származó mintákat hosszában felnyitottam és PBS oldattal átmostam. A dekapitalás során minden egyedből 5 ml vért gyűjtöttem EDTA burkolt vérgyűjtő csövekbe. Ezt követően a vérmintákat 2000 g-vel centrifugáltam 10 percig. A felülúszó plazmát 1 ml-es alikvótokban, kriocsövekbe helyeztem. A mintákat folyékony nitrogénnel hűtöttem, majd -70 °C-on tároltam.

2.1.2 RNS-izolálás, cDNS szintézis és qPCR

A hipotalamusz, mirigyes gyomor és éhbélmintákat folyékony nitrogénben mozsár segítségével porrá őröltem. A totál RNS-t mintánként 30 ± 3 mg homogenizált szövetből vontam ki RNeasy Mini Kit segítségével, DNáz I emésztés beiktatásával a gyártó által leírt protokoll alapján. Az RNS kvantitálását NanoDrop ND-1000 spektrofotométer segítségével végeztem. A kvantitált totál RNS-mintákból 2 μ g-ot Maxima First Strand cDNA szintézis Kit segítségével írtam át, a reakciókondíciók megegyeztek a gyártó ajánlásaival. A reverz transzkripció után a mintákat tízszeresére hígítottam AccuGENE RNáz, DNáz-mentes vízzel. A célgén cDNS-ére specifikus primereket a Primer Express 3.0.1. verziójával terveztem. A qPCR-t triplikátumokban futtattam 96 vályús lemezekben. Stábil referenciagénnek a hipotalamuszban az *ACTB*-t jelöltem ki, míg a többi perifériás szervben az *YWHAZ*-t. A reakciókat egy ABI 7300 real-time PCR gépben (Life Technologies) futattam. A hőmérsékletprofil a következő volt: Uracil-N glikoziláz kezelés: 50 °C 2 perc, kezdeti denaturáció 95 °C 10 perc. 40 cikluson át: denaturáció 95 °C 15 másodperc és primer tapadás/szintézis 60 °C 30 másodperc. A 20 μ l végtérfogatú reakcióelegyek 50 ng cDNS templátot, 1X molarányú Power SYBR Green mastermix-et (Life Technologies) és 200 nM koncentrációban forward és reverz primert tartalmaztak. A reakciók végeztével a nyers fluoreszcens adatokat az SDS 1.3.1 adatgyűjtő szoftverből (Life Technologies) szöveges fájlba exportáltam. A reakcióhatékonyságokat és a C_q értékeket a LinRegPCR 2015.0 verziójával határoztam meg. A primerek specificitását olvadáspont-elemzéssel ellenőriztem. A célgének relatív kvantitálásához a Pfaffl (2001) által leírt képletet használtuk.

2.1.3 Fehérjeizolálás, PACAP-38 radioimmunszé

A hipotalamusz, éhbél és mirigyes gyomor szövetmintákból $75 \pm 7,5$ mg-ot 750 μ l jéghideg AccuGENE vízben homogenizáltam rotor-státor homogenizálóval 30 másodpercig, 30000 rpm-el. A homogenizált mintákat ezután 20000 g-vel 10 percig, 4 °C-on centrifugáltam. A felülúszókat -70 °C-on tároltam a további felhasználásig. A PACAP-38 peptid dupla térfogatú abszolút alkohol és 20 μ l 96%-os ecetsav hozzáadásával került kivonásra. A kicsapás és centrifugálás (1500 g, 10 perc, 4 °C) után a felülúszó leszívására és a minta nitrogén gázzal történő beszárítására került sor. A

szöveti és plazma PACAP-38 immunesszé mérések Jakab és mtsai. (2004) által részletezett lépések alapján történtek.

2.2 Stabilan kifejeződő referenciagének kiválasztása a brojlercsirke hipotalamuszában, különböző takarmányozási állapotok között

2.2.1 Állatok és a kísérleti beállítás

A Ross 308 brojlerkakasokat 28 napos korukig neveltem. Alomként faforgácsot használtam, az itatók Plasson típusúak voltak. A hőmérséklet 32 °C volt az állatok érkezésekor, majd fokozatosan csökkentettem (1,5 °C/hét) azt. A 28. napon a szexált hím egyedeket ketreces volierekbe rendeztem. Három kísérleti csoportot hoztam létre: *ad libitum* takarmányozott (*ad libitum* csoport), 24 órás takarmánymegvonás (F24h csoport), 24 órás takarmánymegvonás-2 órás újraetetés (F24hRF2h csoport). A kísérlet alatt a madarakat brojler nevelő táppal takarmányoztam (20% nyers fehérje, metabolizálható energia: 13 AME_n MJ/kg szárazanyag). A kísérlet alatt mindhárom csoport korlátlanul fért hozzá az ivóvízhez. A 24 órás takarmánymegvonás-2 órás újraetetés elteltével 8 egyedet vágtam le mindhárom csoportból. A madarak terminálása a 2.1.1 fejezetben részletezett módon történt. A mintavétel megegyezett a 2.1.2 fejezetben leírtakkal. A mintákat kriocsövekbe helyeztem, folyékony nitrogénnel hűtöttem, majd -70 °C-on tároltam.

2.2.2 RNS-izolálás, cDNS szintézis és qPCR

A hipotalamusz mintákat folyékony nitrogénben porrá őröltem, majd $25 \pm 2,5$ mg mintát TRI reagens oldatban lizáltam rotor-státor homogenizálóval (Ultra-Turrax T10, IKA, Németország) 30 másodpercig, 30000 rpm-el. A totál RNS-t Direct-zol RNS MiniPrep készlettel vontuk ki, 30 U DNáz I enzimes emésztés beiktatásával 15 percig. Az elúciót 50 µl 70 °C-os AccuGENE RNáz, DNáz-mentes vízzel végeztem. A kvantitált totál RNS-mintákból 800 ng-ot qPCRBIO cDNS szintézis kittel írtam át 20 µl reakció térfogatban. A reakció körülmények a következők voltak: reverz transzkripció 42 °C 30 perc, denaturáció 85 °C 10 perc. Az átírást követően a mintákat tízszeresére hígítottam, majd -20 °C-on tároltam.

A célgén cDNS-ére specifikus primereket a 2.1.2 fejezetben részletezett módon terveztem, a 10 kandidáns referenciagént az irodalmi áttekintésem alapján válogattam össze. A qPCR-t triplikátumokban végeztem, 384 vályús lemezekben LightCycler 480 II qPCR gépben. A triplikátumok Cq értékeit átlagoltam, ha valamelyik érték 0,5 Cq értékkel kiszórt azt kizártam az átlagolásból. A hőmérsékletprofil a következő volt: kezdeti denaturáció 95 °C-on 2 percig, 40 cikluson át: denaturáció 95 °C-on 5 másodpercig, majd primer tapadás-szintézis 60 °C-on 30 másodpercig. A qPCR-t 10 µl végtérfogóban mértem össze, amik 4 ng cDNS templátot, 1X molarányú Xceed qPCR SG Hi-ROX mastermixet és 200 nM koncentrációban forward és reverz primert tartalmaztak. A minták mellett templátmentes kontrollokat és RTáz-mentes kontrollokat is futattam a DNS kontamináció ellenőrzésére. A primerek specificitását olvadási görbékkel ellenőriztem, az amplikonok 60-tól 95 °C-ig történő melegítésével. A reakcióhatékonyságokat és a Cq értékeket a LinRegPCR 2016.0 verziójával határoztam meg.

2.2.3 A 10 referenciagén-jelölt stabilitásvizsgálata

A 10 referenciagén-jelölt stabilitásvizsgálatához öt különböző módszert használtam. A két Excel beépülő applikációt a geNorm-ot (v3.5), illetve a NormFinder-t, (v0.953), valamint a BestKeeper-t (v1) és az összehasonlító ΔC_t módszert a Microsoft Excel 2010-ben (v14.7163.5) futtattam. A Chervoneva és mtsai. (2010) által leírt programkódot az SAS Studio 3.5 szoftverben (SAS Institute, Cary, NC, USA) futtattam. Az egyes módszerekből származó stabilitási értékek alapján rangsoroltam a referenciagéneket, majd a rangsorok geometriai átlagolásával felállítottam a végső rangsort.

2.2.4 A takarmánymegvonás-újraetetés és a növekedés hatása a brojlercsirke MCH gén kifejeződésére, az *MCHR4* és *PMCH* expresszió szövetek közti vizsgálata

2.2.5 Állatok és a kísérleti beállítás, mintavétel

Az állatok tartási körülményei megegyeztek az 2.2.1 fejezetben leírtakkal, illetve a kísérleti beállítás ugyanaz volt a takarmánymegvonás-újraetett csoportokat tekintve. A növekedés kísérlet alatt 8 egyedet vágtam le a 7., 14., 21., 28. (2.2.1 fejezet *ad libitum* csoportjával azonos egyedek) és a 35. napon. A mintavétel a plazma és hipotalamusz minták gyűjtésére vonatkozóan megegyezett az 2.1.1, illetve 2.1.2 fejezetekben leírtakkal. Az élősúlyt digitális mérleggel megmértem a terminálás előtt. A terminálást követően a hasüreget feltártam, a hasüregi zsírt kimetszettem, összegyűjtöttem és a tömegét megmértem. A 28 napos *ad libitum* csoport négy egyede esetén szövetmintát vettem a begyből, mirigyes gyomorból, zúzógyomorból, patkóbélből, éhbélből, csípőbélből, vakbélből és a végbélből is. A levett szövetmintákat kriocsövekbe helyeztem, folyékony nitrogénnel hűtöttem, majd -70 °C-on tároltam.

2.2.6 RNS-izolálás, cDNS szintézis és qPCR

Az RNS-izolálás, cDNS szintézis és qPCR metodikája megegyezik a 2.2.2 részben leírtakkal.

2.2.7 Vérplazma glükóz és inzulin mérések

A kísérletbe vont madaraktól 1 ml (7 napos egyedek) vagy 5 ml (14-35 napos egyedek) vért gyűjtöttem. A további lépések megegyeztek az 2.1.1 fejezetben leírtakkal.

2.2.8 Fehérjeizolálás, MCH radioimmunesszé

A fehérjeizolálás lépései megegyeztek az 2.1.3 fejezetben leírtakkal. A hipotalamusz MCH koncentrációk mérése Lelesz és mtsai. (2016) által leírtak szerint zajlott.

2.3 A takarmánymegvonás hatása a háziatyúk középbelének morfometriájára és az éhbelének proteomjára

2.3.1 Középbél morfometriai mérések

A vizsgált szöveteket kilenc egyedből vettem, melyek közül három egyed *ad libitum* takarmányozott volt, három egyed 24 órán keresztül éheztetett és három egyed 24 órán keresztül éheztetett, majd 2 órán keresztül újraetetésben részesült. A duodenum, jejunum és ileum szövettani metszetek elkészítése megegyezik az immunhisztokémiához tartozó metszetek anyag és módszerével. A metszeteket hematoxin-eozin festésnek vettem alá, majd a lemezeket mikroszkóp segítségével digitalizáltam. A morfometriai méréseket az Adobe Photoshop CC szoftverrel végeztem.

2.3.2 Fehérjeizolálás, kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (2D-DIGE), képelemzés, a fehérjék azonosítása

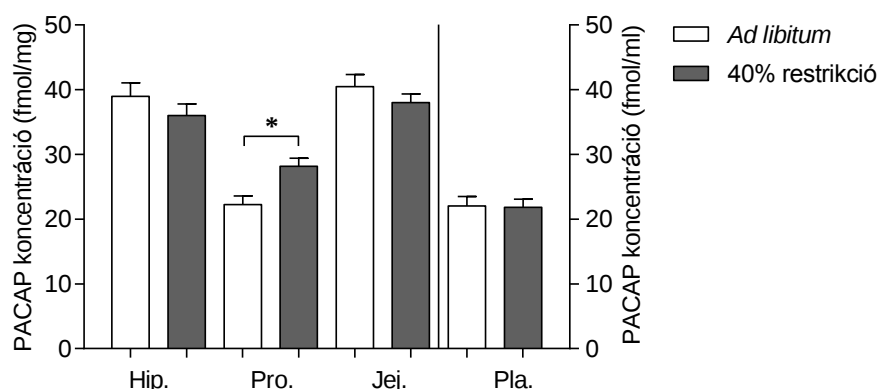
Az éhbélmintákból 100 mg-ot folyékony nitrogénnel dörzsmozsárban porrá őrültem. Minden mintához 500 µl jéghideg lízis puffert adtam, majd lizáltam. A lízist követően a homogenizátumokat centrifugáltam, a felülúszót új csövekbe vittem át. A fehérjekoncentrációt az RC DC Protein esszé készlettel és mikrolemes olvasóval mértem. Két csoport minden mintájából létrehoztam egy mintakeveréket. 50 µg mintakeveréket 400 pmol cianin-2 (Cy2) aminoészter minimál festékkel jelöltem. Minden gélre felvittem 50 µg jelölt fehérje mintát az *ad libitum* és 50 µg mintát a kísérleti csoportból, ezek jelölése 400 pmol cianin-3 (Cy3) vagy 400 pmol cianin-5 (Cy5) használatával történt. Az izoelektromos elválasztáshoz 7 cm-es immobilizált lineáris pH grádiens szalagokat használtam (pH 5-8). A pH szalagokat passzív rehidrációs módszerrel rehidráltam. 150 µg fehérjét, ami 50 µg referenciamintát, 50 µg kontroll és 50 µg kísérleti mintát 125 µl rehidráló pufferben vettem fel, majd a pH csíkkal 16 órán át szobahőn rehidráltam. Az izoelektromos fókuszálást követően az IPG szalagokat ekvilibráltam, majd a fehérjéket molekulatömegük szerint elválasztottam. A foltkivágáshoz a preparatív poliakrilamid géleket kolloid Coomassie G-250 festéssel tettem láthatóvá. A DIGE géleket digitalizáltam, a képeket a Delta2D 4.3 szoftverrel

elemeztem. A foltok normalizálásához és kvantitálásához a belső sztenderdet (Cy2-vel jelölt foltok) használtam fel. A kísérleti csoport adott fehérjefolt százalékos intenzitását (V%) a referenciagél azonos foltjához (100%) viszonyítva számolta ki a szoftver. A statisztikai próba (kétmintás t-teszt) alapján szignifikáns expressziós különbséget mutató foltokat steril fülke alatt kivágtam a Coomassie-festett preparatív gélből. A fehérjék emésztése Shevchenko és mtsai. (2006) által leírt módon történt. Az emésztett mintákat Bhide és mtsai. (2009) által részletezett módon készítettem elő a tömegspektrometriás mérésre. A peptidek azonosítása egy LIFTTM-MS/MS-el kapcsolt mátrix-asszisztált lézer deszorpció, ionizáció (MALDI) tömegspektrométerrel zajlott. Az így kapott peptidszekvenciák alapján a fehérjék végső azonosítását az NCBI-n és a SwissProt adatbázisban a Mascot keresőszoftverrel végeztem.

3 EREDMÉNYEK

3.1 A 40%-os takarmánykorlátozás hatása a tojótípusú házityúk takarmányfelvételt szabályzó peptidjeinek és receptorainak kifejeződésére

Megmértem a kiválasztott célgénjeink expresszióját qPCR, illetve a PACAP-38 koncentrációját RIA módszerrel 40%-os takarmánykorlátozásnak kitett és az *ad libitum* egyedek egyes szöveteiben. A Cq értékek alapján a legtöbb gén közepes expressziót mutatott a vizsgált szövetekben, Cq átlagértékek nagyobbak voltak, mint 20. A PACAP-ot kódoló gén (*ADCYAP1*) hipotalamuszban mért expressziója volt a legnagyobb, átlag Cq érték 13,8 volt, míg a mirigyes gyomorban és az éhbélben a *GAL* fejeződött ki leginkább (24,9, illetve 21,9). Ez azt jelzi, hogy a PACAP központi idegrendszerben, míg a *GAL* inkább a periférián tölthet be jelentősebb szerepet a vizsgált szövetekkel szemben. Takarmánykorlátozás hatására a hipotalamuszban 63%-os növekedést az *NMUR1* és 49%-ot a *PAC1* gén kifejeződésében (1. táblázat). A mirigyes gyomor esetén egyedül az *ADCYAP1* mutatott 88%-al nagyobb expressziós különbséget. Az éhbélminták esetén a *GAL*, *NMU*, *NMUR1* több mint háromszoros, az *ADCYAP1* majdnem háromszoros expressziós különbséget mutatott a 40%-os takarmánykorlátozott csoporthoz képest. A PACAP-38 mérhető koncentrációban volt jelen mindegyik szövettípusban. A takarmánykorlátozás hatására szignifikáns növekedést egyedül a mirigyes gyomorban mértem, itt 21%-al nőtt meg a peptid koncentrációja (1. ábra). Eddig nem született olyan tanulmány, ami a PACAP-38 koncentrációját vizsgálta volna a házityúk vérplazmájában. A PACAP-38 átlagos koncentrációja az *ad libitum* csoport esetén 22,03 fmol/ml volt, ami 13-szor kisebb, mint a kecske, bárány vagy szarvasmarha plazmakoncentrációk (Czeplédi és mtsai., 2011). A PACAP-38 hasonló koncentrációban van jelen a brojlercsirke hipotalamuszában is (Józsa és mtsai., 2005).



1. ábra: A PACAP-38 radioimmunszéssel mért koncentrációja a különböző szövetekben és a vérplazmában. Hip.: hipotalamusz; Pro.: mirigyes gyomor; Jej.: éhbél; Pla.: plazma. Az átlag $\pm$ SEM értékeket jelenítettem meg.

1. táblázat: A 40%-os takarmánykorlátozás hatása a választott célgének kifejeződésére. Az átlag $\pm$ SEM értékeket jelenítettem meg

gén	hipotalamusz		mirigyes gyomor		éhbél	
	<i>ad lib.</i>	40% restr.	<i>ad lib.</i>	40% restr.	<i>ad lib.</i>	40% restr.
<i>ADCYAP1</i>	1 $\pm$ 0,06	1,26 $\pm$ 0,10	1 $\pm$ 0,05	1,88* $\pm$ 0,09	1 $\pm$ 0,03	2,76* $\pm$ 0,08
<i>GAL</i>	1 $\pm$ 0,05	1,3 $\pm$ 0,14	1 $\pm$ 0,11	1,52 $\pm$ 0,32	1 $\pm$ 0,02	3,08* $\pm$ 0,02
<i>NMU</i>	1 $\pm$ 0,04	1,39 $\pm$ 0,02	1 $\pm$ 0,06	0,69 $\pm$ 0,07	1 $\pm$ 0,02	3,41* $\pm$ 0,19
<i>NMUR1</i>	1 $\pm$ 0,02	1,63* $\pm$ 0,04	1 $\pm$ 0,07	0,90 $\pm$ 0,20	1 $\pm$ 0,05	3,01* $\pm$ 0,09
<i>NMUR2</i>	1 $\pm$ 0,02	1,5 $\pm$ 0,10	1 $\pm$ 0,01	1,04 $\pm$ 0,06	1 $\pm$ 0,02	0,52 $\pm$ 0,01
<i>PAC1</i>	1 $\pm$ 0,02	1,49* $\pm$ 0,03	1 $\pm$ 0,03	1,07 $\pm$ 0,12	1 $\pm$ 0,13	1,01 $\pm$ 0,02

A kísérletemben az 5 napon át tartó 40%-os takarmánykorlátozás nem gyakorolt hatást sem a PACAP mRNS, sem a PACAP-38 peptid koncentrációjára, habár a PACAP receptor kifejeződése megnőtt a hipotalamuszban. Józsa és mtsai (2005) 36 órás takarmánymegvonás hatására növekedést mértek a brojlercsirke hipotalamuszában. A takarmánymegvonás nagy hatást gyakorol a gasztrointesztinális rendszer perisztaltikájára. Éhezéskor lassulni kezd, majd megáll, illetve a perisztaltika megfordulhat (Clench és Mathias, 1995). Számos takarmányfelvételt szabályzó peptid mellett a PACAP is jelen van a madarak gasztrointesztinális rendszerben ahol részt vesznek a motilitás szabályzásában, mint simaizom relaxánsok (Monir és mtsai., 2014; Yoshida és mtsai., 2000). A PACAP gyomor motilitást csökkentő hatását írták le, perifériás injekció után (Ozawa és mtsai., 1999). Kérdéses maradt, mivel magyarázható, hogy a PACAP-ot kódoló gén expressziója nem változott a kísérlet hatására, míg a receptorát kódoló *PAC1* expressziója megemelkedett.

Feltételezzem, hogy a PACAP koncentrációjának növekedése a mirigyes gyomorban a csökkent takarmánymennyiség hatására bekövetkező csökkenő motilitásnak tudható be. Jelenleg még nem, ismert melyik szövet választja ki és milyen stimulus hatására került a PACAP a házityúk vérplazmájába, valószínűleg nem a takarmányellátottság hatására, mivel a plazma koncentrációja változatlan maradt a kísérlet után. A galanin ICV injektálása fokozza a takarmányfelvételt emlősök és madarak esetén is (Ando és mtsai., 2000; Tachibana és mtsai., 2008). A galanin immunhisztokémiás vizsgálata a házityúk gasztrointesztinális rendszerének izom rétegeiben szintén a motilitás szabályzó szerepére enged következtetni (Salvi és mtsai., 1999). A kísérletemben a galanint kódoló gén expressziója az éhbélben nőtt meg a takarmánykorlátozott csoport esetén. A galanin kontrakciófokozó hatását írták le a középbél esetén (DeGolier és mtsai., 1999).

3.2 Stabilan kifejeződő referenciagének kiválasztása a brojlercsirke hipotalamuszában, különböző takarmányozási állapotok között

A referenciagén-jelöltek expressziós stabilitását öt különböző módszerrel vizsgáltam összevont, és a három kísérleti körülmény kombinálásában is. Összevont kísérleti körülmények között a BestKeeper elemzés alapján azt találtam, hogy minden referenciagén-jelölt Cq értékének szórása 1 alatt van. A B2M mutatta a legnagyobb szórást (0,66) míg a TBP a legkisebbet (0,29). A stabilitási értékek alapján kapott rangsort a 2. táblázatban mutatom be. A geNorm elemzés során minden gén az ajánlott küszöbérték (0,5 M) alatt volt. A legkevésbé stabilnak a B2M és az RN18S mutatkozott (0,423 és 0,476), míg a TBP és RPS17 volt a legstabilabb expressziójú.

2. táblázat: Az összevont kísérleti körülmények között az öt módszerrel kapott rangsorok

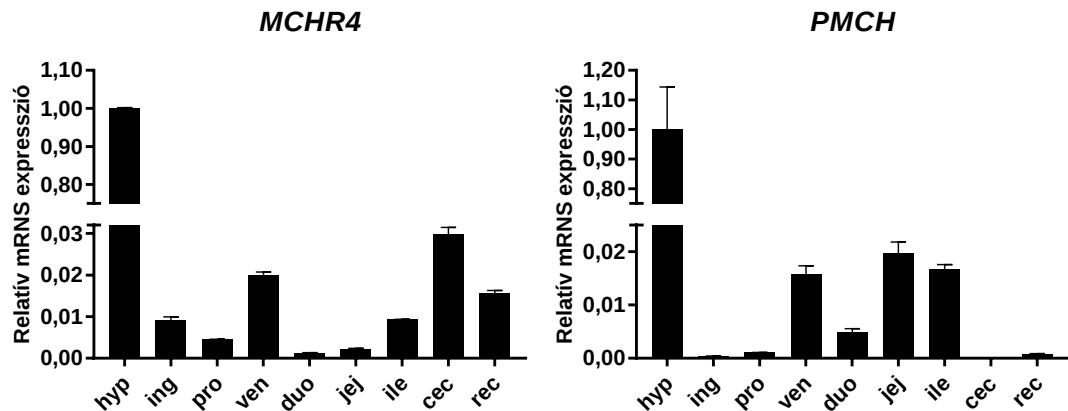
gén	végso rang ¹	Best- Keeper ²	geNorm	Chervonev a és mtsai. (2010)	Norm- Finder	ΔC_t módszer
<i>ACTB</i>	6	3	7 (0,332) ³	8 (779,39)	6 (0,136)	6 (0,42)
<i>B2M</i>	9	8	9 (0,423)	9 (982,30)	10 (0,220)	9 (0,65)
<i>GAPDH</i>	5	7	5 (0,266)	6 (581,32)	2 (0,103)	5 (0,42)
<i>HMBS</i>	4	6	3 (0,231)	3 (189,67)	4 (0,116)	3 (0,40)
<i>LBR</i>	7	5	8 (0,362)	5 (542,01)	7 (0,138)	7 (0,47)
<i>POLR2B</i>	2	4	4 (0,239)	2 (36,32)	1 (0,096)	4 (0,42)
<i>RN18S</i>	10	10	10 (0,476)	10 (1023)	9 (0,189)	10 (0,69)
<i>RPS17</i>	3	2	1 (0,215)	4 (215,08)	5 (0,124)	2 (0,40)
<i>TBP</i>	1	1	1 (0,215)	1 (8,42)	3 (0,114)	1 (0,39)
<i>YWHAZ</i>	8	9	6 (0,301)	7 (725,94)	8 (0,164)	8 (0,49)

¹mértani közepe a többi rangnak, ²stabilitási érték.

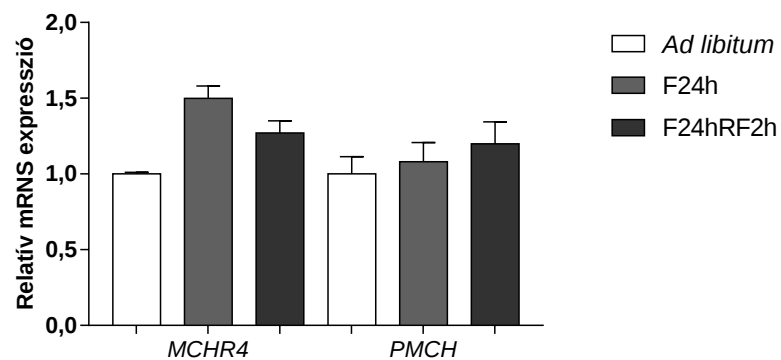
Eredményeink alapján a *TBP* ideális referenciagén-jelölt az *ad libitum*-éhezés-újraetetés kísérleti körülmények között, annak expressziója mutatta a legnagyobb stabilitást a 10 referenciagén-jelölt közül. A *TBP* a TATA-kötő fehérjét kódolja, ami egy transzkripció faktor, az RNS polimeráz II preiniciációs komplex része és az eukarióta sejtek bazális transzkripciójának alapeleme (Boeger és mtsai., 2005).

3.3 A takarmánymegvonás-újraetetés és a növekedés hatása a brojlercsirke MCH gén kifejeződésére, az *MCHR4* és *PMCH* expresszió szövetek közti vizsgálata

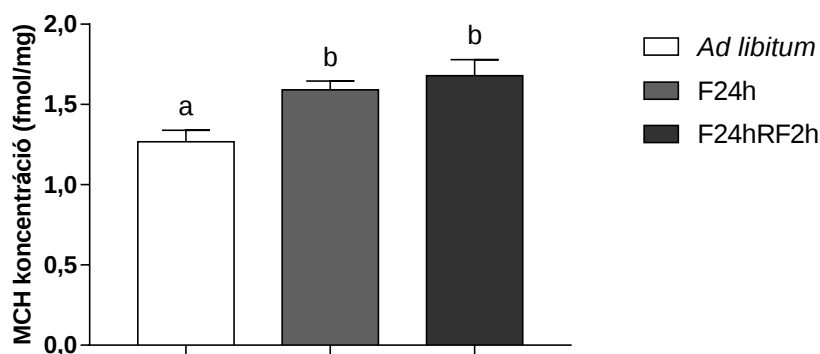
A takarmányozottsági állapotok nem gyakoroltak hatást a *PMCH* sem az *MCHR4* mRNS expressziójára. A 24 órás éhezés, 25,65%-os növekedést okozott az MCH peptid koncentrációjában, a 2 órás újraetetés további 32,51%-os növekedést okozott az *ad libitum* állapothoz képest. Csökkenő trendet figyeltem meg a *PMCH* és *MCHR4* mRNS szintekben a növekedés előrehaladtával, ami az MCH koncentrációkban is megmutatkozott, a vérplazma inzulin koncentrációja szintén növekvést mutatott. A korreláció elemzés alapján az MCH peptid koncentrációja és a hasüregi zsír mennyisége nem korrelál egymással, sem az olyan adipozitás szignálokkal, mint a vérplazma glükóz vagy inzulin koncentrációi az *ad libitum* takarmányozott egyedekben. Az *MCHR4* és *PMCH* kifejeződése főleg a hipotalamuszra korlátozódik, a GIT mentén alig fejeződnek ki (2. ábra). A *PMCH* gén végterméke az MCH peptid koncentrációja fokozódik a 24 órás éhezés hatására, majd az azt követő 2 órás újraetetés hatására tovább növekedik.



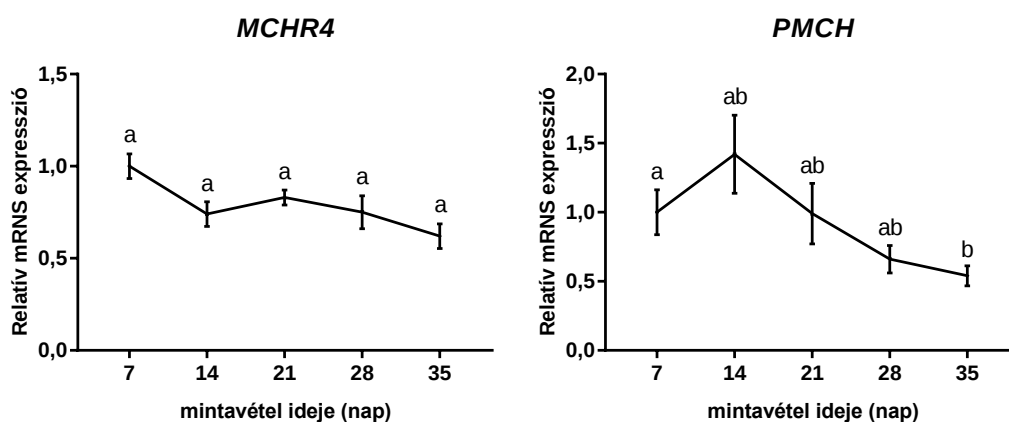
2. ábra: Az *MCHR4* és *PMCH* gén expressziójának szöveti összehasonlítása. hyp.: hipotalamusz; ing.: begy; pro.: mirigyes gyomor; ven.: zúzógyomor; duo.: patkóbél; jej.: éhbél; ile.: csípóbél; cec.: vakbél; rec.: végbél. A hipotalamuszhoz viszonyított expressziót ábrázoltam. Az átlag $\pm$ SEM értékeket jelenítettem meg.



3. ábra: A takarmánymegvonás-újraetetés hatása az *MCHR4* és *PMCH* gének kifejeződésére a hipotalamuszban. A csoportok között nincs különbség. Az átlag $\pm$ SEM értékeket jelenítettem meg.



4. ábra: A takarmánymegvonás-újraetetés hatása az MCH peptid koncentrációjára a hipotalamuszban. Az MCH koncentrációt fmol/mg szövettömegben fejeztem ki. Az átlag $\pm$ SEM értékeket jelenítettem meg.



5. ábra: Az *MCHR4* és *PMCH* hipotalamuszban mért génexpressziójának szöveti összehasonlítása. Az első időponthoz viszonyított relatív expressziót ábrázoltam. Az átlag $\pm$ SEM értékeket jelenítettem meg.

A varianciaelemzés alapján az éhezés-újraetetés nem befolyásolta a két célgén mRNS szintjét (3. ábra). Az MCH peptid koncentrációját tekintve a 24 órás éhezés hatására 25,65%-os növekedés ($P=0,0202$) következett be a hipotalamuszban. A 24 órás éhezést követő 2 órás újraetetés további 32,51%-os növekedést ($P=0,0033$) okozott az *ad libitum* csoporthoz képest (4. ábra). Hasonló trend figyelhető meg a *PMCH* expresszió és az MCH koncentrációk változásában. Az *ad libitum* takarmányozott brojlercsirke hipotalamuszban mért MCH peptid átlagos (1,27 fmol/mg) koncentrációja hasonló a patkány hipotalamuszban (~1,3 fmol/mg) mért értékhez (Lelesz és mtsai., 2016).

A két gén kifejeződésének növekedéssel összefüggő követése alapján megállapítottam, hogy az *MCHR4* kifejeződése nem változott a növekedéssel, a *PMCH*-val hasonlítva nagyobb biológiai szórást tapasztaltam. A *PMCH* esetén 0,54-szeres

($P=0,0184$) csökkenést mértem az első (7. nap) és az utolsó (35. nap) mintavétel között. A többi összehasonlításban nem volt változás (5. ábra). A lineáris trend elemzés szerint a csoportátlagok átlagos csökkenése $-0,075$, az egyes időpontok között ($P=0,0013$) az *MCHR4* és $-0,168$ volt a *PMCH* ($P=0,0066$) esetén. Az MCH peptid koncentrációk változása nem volt jelentős ($P>0,05$) de itt is csökkenő trend figyelhető meg ($-0,0848$ és $P=0,0027$) a növekedés függvényében. A nem-lineáris trendelemzés nem mutatott a lineáristól eltérő trendet. Az MCH koncentráció a hipotalamuszban $0,971-2,029$ fmol/mg szövettömeg volt. A Spearman korrelációelemzés szerint a hasüregi zsír és az élősúly pozitívan korrelál, a két paraméter együtt változik közepesen szoros korrelációt mutatva. A többi összehasonlításban gyenge ($r<0,4$) korrelációt állapítottam meg (3. táblázat).

3. táblázat: A mért paraméterek Spearman korrelációelemzése

	hasüregi zsír	élősúly	glükóz	inzulin	MCH konc.
hasüregi zsír	1	0,642 (0,009) ¹	0,088 (0,753)	0,223 (0,421)	0,027 (0,920)
élősúly		1	0,174 (0,533)	0,255 (0,356)	-0,106 (0,694)
glükóz			1	0,266 (0,334)	0,215 (0,437)
inzulin				1	-0,136 (0,334)
MCH konc. ²					1

¹P érték a zárójelben, ²az MCH peptid koncentrációja a hipotalamuszban

A *PMCH* gén fokozott kifejeződését írták le 48 órán át éhezett broilercsirkék hipotalamuszában (Song *et al.*, 2012) Az eredményeink összhangban vannak a szakirodalmi megfigyelésekkel. Az orexigén hatású neuropeptid Y (NPY) kifejeződését vizsgálva Saneyasu és mtsai. (2013) azt találták, hogy a peptidet kódoló mRNS szint csökkenő trendet mutat a broilercsírke hipotalamuszában. Az NPY expressziója szintén csökkenő trendet mutat az növekedés előrehaladtával a tojócsírke hipotalamuszában, míg az anorexigén *POMC* gén átírása pedig fokozódik a növekedéssel (Honda és mtsai., 2015). Ehhez hasonlóan a CART peptid (anorexigén hatású) fokozódását írták le a házityúk hipotalamuszában (Cai és mtsai., 2015). Összességében megállapítható, hogy az orexigén peptideket kódoló gének csökkenő, míg az anorexigén peptideket kódoló génen növekvő trendet mutatnak expressziójukat tekintve a növekedés előrehaladtával.

3.4 A takarmánymegvonás hatása a háziatyúk középbélének morfológiájára és az éhbélének proteomjára

A patkóbél esetén az újraetetés hatására a kripták mélysége 17%-al nőtt az éhezést követő újraetetés hatására, míg a többi mért paraméterben nem tapasztaltam változást. Az éhbél esetén éhezés alatt a villusok területe 21,4%-al csökkent, majd újraetetés hatására szignifikáns növekedést mutatott, de 14,3%-al a kontroll érték alatt maradt. Az ileum esetén a 24 órás megvonás és 2 órás újraetetés 33,3%-al növelte a villus területét, valamint 10%-al a kripták mélységét. A *muscularis externa* vastagságát egyik esetben sem befolyásolta a kísérlet. A kelést követő 32-48 óránál tovább éhezett brojlerok teljesítménye csökken, ami a középbél megkésett fejlődésének is betudható (Bhanja és mtsai., 2010). Takarmánymegvonás hatására mind a villusok felületének, a villusonkénti kripták számának, a kripták mélységének, mind pedig az osztódásban lévő sejtek számának csökkenését, valamint mind a három középbél szakasz hosszának rövidülését írták le (Gonzales és mtsai., 2003). A tömegspektrometriás elemzés 11 fehérje foltot azonosított sikeresen (4. táblázat). Az UniProt fehérje adatbázis szerint celluláris lokalizációjukat tekintve az azonosított fehérjék közül 4 az extracelluláris térbe szekretálódó (APOA1, APOA5, MUC6, EXFABP), 4 sejtív komponens (ACTA2, ACTB, KRT14, TPM1), 1 sejtmembrán fehérje (MAGT1), 1 citoplazmatikus fehérje (CHP1), 1 a sejtmagban található fehérje (HSP90AA1). Biológiai funkciójukat tekintve ezek a sejtív komponensei, a zsírsavkötésben és transzportban és az általános stresszválaszban, illetve az ion- és vezikula transzportban részt vevő fehérjék. A morfológiai méréseink szerint az éhbél villus területeinek csökkenése volt megfigyelhető a 24 órás takarmánymegvonás hatására, ami két órás újraetetést követően növekedésnek indult. Így feltételezhetjük, hogy az azonosított struktúrfehérjék kifejeződésének változása a villusok dinamikus változásához köthető, mivel az éhbél további morfológiai paramétereiben nem tapasztaltam változást. A középbél mucin rétegének elvékonyodásáról a szakirodalom már beszámolt (Smirnov és mtsai., 2004). Eredményeink szerint a gélképző mucin 6 fehérje csökkent kifejeződése állhat ennek a jelenségnek a hátterében. A zsírsavanyagcserében résztvevő fehérjék megváltozott szintje valószínűleg a vérplazma csökkent glükóz szintjéhez és a takarmánymegvonás hatására bekövetkező fokozott reverz lipidtranszporthoz (Peebles és mtsai., 2004) köthető.

4. táblázat: A tömegspekrométerrel azonosított fehérjék

azonosított fehérje	adatbázis azonosító	kódoló gén	N/C ¹	arány ²	P érték	tömeg (kDa) ³	pI ⁴
aktin, citoplazma-típus	P60706	<i>ACTB</i>	18/41	2,05	0,034	41,7	5,29
aktin, simaizom-típus	P08023	<i>ACTA2</i>	17/52	9,97	0,013	33	5,46
apolipoprotein A1	P08250	<i>APOA1</i>	16/31	1,57	0,048	30,7	5,58
apolipoprotein A5	XP_417939	<i>APOA5</i>	21/34	-1,54	0,044	40,3	6,26
extracelluláris zsírsavkötő fehérje	P21760	<i>EXFABP</i>	9/34	1,56	0,017	20,2	5,56
hőszokkfehérje 90 kDa alfa A osztály 1	P11501	<i>HSP90AA1</i>	11/14	1,65	0,009	84	5,01
kalcineurin B homológ fehérje 1	Q5ZM44	<i>CHP1</i>	21/79	2,77	0,022	22,4	4,97
keratin, I típus citoszkeletális 14	Q6PVZ1	<i>KRT14</i>	19/20	4,32	0,014	51,0	5,02
magnézium transzporter fehérje 1	Q5ZJ06	<i>MAGT1</i>	10/19	11,07	0,013	36,7	9,66
mucin-6	F1NBL0	<i>MUC6</i>	17/12	-1,63	<0,001	132	5,78
tropomiozin alfa-1	P04268	<i>TPM1</i>	19/32	2,36	0,031	32,8	4,7

¹Azonosított peptidek száma és azok százalékos szekvencia lefedettsége

²Az *ad libitum* csoporthoz viszonyított arány az intenzitás % átlag értékek alapján

³Elméleti molekulatömeg és ⁴izoelektromos pont (pI) a SwissProt fehérje adatbázis szerint

4 AZ ÉRTEKEZÉS ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEI

1. Elsőként sikerült megállapítanom a PACAP-38 koncentrációját a házityúk vérplazmájában (22,03 fmol/ml). A 40%-os takarmánykorlátozás hatására 1,88-szoros növekedést mutatott a *PACAP* gén expressziója, és 27% növekedést a PACAP peptid koncentrációja a mirigyes gyomor esetén.

2. Megállapítottam, hogy az éhbél epitéliuma és kriptái, valamint a mirigyes gyomor epitéliuma expresszál több $INSR\alpha$ -t 40%-os takarmánykorlátozás hatására az *ad libitum* csoporthoz képest.

3. A *TBP* gén kifejeződését nem befolyásolja az energia- és táplálóanyag-ellátottság a brojlercsirke hipotalamuszában, így a hasonló jellegű génexpressziós kísérletekben megbízható referenciagénként használható.

4. A táplálóanyag ellátottság nem gyakorolt hatást sem a *PMCH* sem az *MCHR4* mRNS expressziójára.

5. Csökkenő trendet figyeltem meg az *MCHR4* és a *PMCH* mRNS szintekben a növekedés előrehaladtával, ami az MCH koncentrációkban is megmutatkozott, a vérplazma inzulin koncentrációja szintén növekvést mutatott. Az *MCHR4* és *PMCH* kifejeződése főleg a hipotalamuszra korlátozódik.

6. A *PMCH* gén terméke, az MCH peptid koncentrációja fokozódik a 24 órás éhezés hatására, majd az azt követő 2 órás újraetetés hatására tovább emelkedik. Legalább 1,5-szeres növekedett expressziós különbséget mutattak a 24 órás takarmánymegvonást követően az éhbélben az *ad libitum* csoporthoz képest az alábbi fehérjék: aktin (citoplazma-típusú), aktin (simaizom-típusú), apolipoprotein A1, extracelluláris zsírsavkötő fehérje, hősokkfehérje 90 kDa alfa A osztály 1, calcineurin B homológ fehérje 1, keratin (citoszkeletális 14-es típus), magnézium transzporter fehérje 1 és a tropomiozin alfa-1. Két fehérje pedig csökkent kifejeződést mutatott: az apolipoprotein A5 és a mucin-6.

5 AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

A kísérleteim során megállapított stabil referenciagén (*TBP*) hasznos lehet a házityúk további neuropeptidjeinek qPCR-es vizsgálatakor, mivel az kifejeződését tekintve a takarmányfelvételtől független, megbízható normalizációs génnek bizonyult. A dolgozatban vizsgált, takarmányfelvételben szerepet játszó géneket fel lehet használni a jövőbeli marker asszociált szelekcióra esetleg állategészségügyi, állatjóléti vizsgálatokra.

A házityúk éhbelében takarmánymegvonás hatására bekövetkező proteomikai változások további kutatásokhoz nyújtanak alapinformációkat elősegítve ezzel az éhbelben takarmánymegvonás alatt zajló folyamatok teljesebb megértését.

6 IRODALOMJEGYZÉK

1. Ando, R. – Bungo, T. – Kawakami, S. I. – Shimojo, M. – Masuda, Y. – Furuse, M.: 2000. Intracerebroventricular injection of mammalian motilin, melanin-concentrating hormone or galanin does not stimulate food intake in neonatal chicks. *British Poultry Science*. 41. 4: 508–511.
2. Bhanja, S. K. – Devi, C. A. – Panda, A. K. – Sunder, C. S.: 2010. Effect of Post-hatch Nutrient Intubation on Performance, Intestinal Growth, Meat Yield and Immune Response in Broiler Chickens. *Asian–Australasian Journal of Animal Sciences*. 23. 4: 515–520.
3. Bhide, M. R. – Escudero, R. – Camafeita, E. – Gil, H. – Jado, I. – Anda, P.: 2009. Complement factor H binding by different Lyme disease and relapsing fever *Borrelia* in animals and human. *BMC Research Notes*. 2. 1: 134.
4. Boeger, H. – Bushnell, D. A. – Davis, R. – Griesenbeck, J. – Lorch, Y. – Strattan, J. S. – Westover, K. D. – Kornberg, R. D.: 2005. Structural basis of eukaryotic gene transcription. *FEBS Letters*. 579. 4: 899–903.
5. Boswell, T.: 2005. Regulation of energy balance in birds by the neuroendocrine hypothalamus. *The Journal of Poultry Science*. 42. 3: 161–181.
6. Chervoneva, I. – Li, Y. – Schulz, S. – Croker, S. – Wilson, C. – Waldman, S. A. – Hyslop, T.: 2010. Selection of optimal reference genes for normalization in quantitative RT–PCR. *BMC Bioinformatics*. 11. 1: 1.
7. Clench, M. – Mathias, J.: 1995. Motility Responses to Fasting in the Gastrointestinal–Tract of 3 Avian Species. *Condor*. 97. 4: 1041–1047.
8. Czeglédi, L. – Tamás, A. – Börzsei, R. – Bagoly, T. – Kiss, P. – Horváth, G. – Brubel, R. – Németh, J. – Szalontai, B. – Szabadfi, K.: 2011. Presence of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the plasma and milk of ruminant animals. *General and Comparative Endocrinology*. 172. 1: 115–119.
9. DeGolier, T. F. – Nordell, J. N. – Pust, M. H. – Duke, G. E.: 1999. Effect of galanin on isolated strips of smooth muscle from the gastrointestinal tract of chickens. *Journal of Experimental Zoology*. 283. 4–5: 463–468.
10. Delfino, K. R. – Southey, B. R. – Sweedler, J. V. – Rodriguez-Zas, S. L.: 2010. Genome-wide census and expression profiling of chicken neuropeptide and prohormone convertase genes. *Neuropeptides*. 44. 1: 31–44.

11. Denbow, D. M.: 1994. Peripheral regulation of food intake in poultry. *The Journal of Nutrition*. 124. 8 Suppl: 1349S–1354S.
12. Gonzales, E. – Kondo, N. – Saldanha, E. – Loddy, M. – Careghi, C. – Decuyper, E.: 2003. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. *Poultry Science*. 82. 8: 1250–1256.
13. Griffin, C. – Flouriot, G. – Sharp, P. – Greene, G. – Gannon, F.: 2001. Distribution analysis of the two chicken estrogen receptor–alpha isoforms and their transcripts in the hypothalamus and anterior pituitary gland. *Biology of Reproduction*. 65. 4: 1156–1163.
14. Internet 1: <http://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/data/database>
15. Jakab, B. – Reglődi, D. – Józsa, R. – Hollósy, T. – Tamás, A. – Lubics, A. – Lengvári, I. – Oroszi, G. – Szilvássy, Z. – Szolcsányi, J. – Németh, J.: 2004. Distribution of PACAP–38 in the central nervous system of various species determined by a novel radioimmunoassay. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 61. 1–2: 189–198.
16. Józsa, R. – Németh, J. – Tamás, A. – Hollósy, T. – Lubics, A. – Péter, S. – Oláh, A. – Lengvári, I. – Reglődi, D.: 2005. Short-term fasting differentially affects PACAP and VIP levels in rats and chicken. *Regulatory Peptides*. 130. 3: 166–166.
17. Lelesz, B. – Szilvássy, Z. – Tóth, G. – Tóth, A. – Enyedi, A. – Felszeghy, E. – Varga, A. – Juhász, B. – Németh, J.: 2016. Radioanalytical methods for the measurement of melanin concentrating hormone (MCH) and detection its receptor in rat tissues. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. 310. 3: 1325–1333.
18. Monir, M. – Hiramatsu, K. – Yamasaki, A. – Nishimura, K. – Watanabe, T.: 2014. The Influence of Restricted Feeding on Glucagon–Like Peptide–1 (GLP–1) – Containing Cells in the Chicken Small Intestine. *Anatomia, Histologia, Embryologia*. 43. 2: 153–158.
19. Ozawa, M. – Aono, M. – Moriga, M.: 1999. Central effects of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) on gastric motility and emptying in rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 44. 4: 735–743.
20. Peebles, E. – Burnham, M. – Walzem, R. – Branton, S. – Gerard, P.: 2004. Effects of fasting on serum lipids and lipoprotein profiles in the egg-laying hen (*Gallus domesticus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 138. 3: 305–311.

21. Pfaffl, M. W.: 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 29. 9: e45.
22. Salvi, E. – Vaccaro, R. – Renda, T. G.: 1999. Ontogeny of galanin-immunoreactive elements in the intrinsic nervous system of the chicken gut. *The Anatomical Record*. 254. 1: 28–38.
23. Shevchenko, A. – Tomas, H. – Havli, J. – Olsen, J. V. – Mann, M.: 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*. 1. 6: 2856–2860.
24. Smirnov, A. – Sklan, D. – Uni, Z.: 2004. Mucin dynamics in the chick small intestine are altered by starvation. *The Journal of Nutrition*. 134. 4: 736–742.
25. Song, Z. – Liu, L. – Yue, Y. – Jiao, H. – Lin, H. – Sheikahmadi, A. – Everaert, N. – Decuypere, E. – Buyse, J.: 2012. Fasting alters protein expression of AMP-activated protein kinase in the hypothalamus of broiler chicks (*Gallus gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology*. 178. 3: 546–555.
26. Tachibana, T. – Mori, M. – Khan, M. S. I. – Ueda, H. – Sugahara, K. – Hiramatsu, K.: 2008. Central administration of galanin stimulates feeding behavior in chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 151. 4: 637–640.
27. Yoshida, M. – Aizawa, H. – Takahashi, N. – Shigyo, M. – Hara, N.: 2000. Pituitary adenylate cyclase activating peptide mediates inhibitory nonadrenergic noncholinergic relaxation. *European Journal of Pharmacology*. 395. 1: 77–83.

7 PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/270/2018.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Simon Ádám
Neptun kód: BGLZO
Doktori Iskola: Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola
MTMT azonosító: 10045842

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

1. **Simon, Á.**, Jávor, A., Czeglédi, L.: A hipotalamikus neuropeptidok szerepe a gazdasági állatfajok takarmányfelvételének szabályozásában: irodalmi áttekintés.
Agrártud. Közl. 65, 63-68, 2015. ISSN: 1587-1282.

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (2)

2. **Simon, Á.**, Oláh, J., Komlósi, I., Jávor, A., Németh, J., Szilvássy, Z., Reglődi, D., Tamás, A., Czeglédi, L.: Changes in expression of neuropeptides and their receptors in the hypothalamus and gastrointestinal tract of calorie restricted hens.
Acta Biol. Hung. 68 (3), 237-247, 2017. ISSN: 0236-5383.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1556/018.68.2017.3.1>
IF: 0.439
3. **Simon, Á.**, Zakárné Aszalós, Z., Jávor, A., Czeglédi, L.: Reference genes for livestock gene expression profiling.
Agrártud. Közl. 73, 81-89, 2017. ISSN: 1587-1282.

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (2)

4. **Simon, Á.**, Németh, J., Jávor, A., Komlósi, I., Bai, P., Oláh, J., Juhász, B., Kiss, R., Szilvássy, Z., Czeglédi, L.: Feeding state and age dependent changes in melanin-concentrating hormone expression in the hypothalamus of broiler chickens.
Acta Biochim. Pol. 65 (2), 251-258, 2018. ISSN: 0001-527X.
DOI: http://dx.doi.org/10.18388/abp.2017_2362
IF: 1.239 (2017)
5. **Simon, Á.**, Jávor, A., Bai, P., Oláh, J., Czeglédi, L.: Reference gene selection for reverse transcription quantitative polymerase chain reaction in chicken hypothalamus under different feeding status.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 102 (1), 286-296, 2018. ISSN: 0931-2439.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12690>
IF: 1.607 (2017)





Idegen nyelvű konferencia közlemények (1)

6. **Simon, Á.**, Papp, E., Zakarné Aszalós, Z., Oláh, J., Jávör, A., Czeglédi, L.: Age-related expression of genes involved in chicken feed intake regulation and correlation analysis with broiler abdominal fat pad.
In: Tavaszí Szél = Spring Wind 2017 : I. Kötet. Agrártudomány Állam-és jogtudomány
Biológiatudomány Föld- és fizikatudomány Had-és rendészettudomány Hittudomány. Szerk.:
Keresztes Gábor, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest, 88-94, 2017. ISBN:
9786155586187

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (2)

7. Czeglédi, L., **Simon, Á.**, Mészár, Z. M., Oláh, J., Németh, J., Szilvássy, Z., Juhász, B., Komlósi, I.,
Jávör, A.: Takarmánykorlátozás hatása a házityúk inzulin receptorának expressziójára.
In: Magyar Farmakológiai, Anatómus, Mikrocirkulációs és Élettani Társaságok Közös
Tudományos Konferenciája, FAME, Pécs, 33, 2016.
8. Gulyás, G., **Simon, Á.**, Jávör, A., Czeglédi, L.: Takarmánykorlátozás hatása a házityúk
vékonybelének proteomjára.
In: Omikai Fórum, MTA DAB Genomika és Proteomika Munkabizottság, Debrecen, 3, 2016.

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (3)

9. **Simon, Á.**, Németh, J., Oláh, J., Komlósi, I., Czeglédi, L.: Melanin-concentrating hormone (MCH)
and the regulation of feed intake in chickens.
In: Tavaszí szél konferencia 2018 Nemzetközi multidiszciplináris konferencia :
Absztraktkötet. Szerk.: Keresztes Gábor, Doktoranduszok Országos Szövetsége, Budapest,
45, 2018. ISBN: 9786155586262
10. **Simon, Á.**, Mészár, Z. M., Oláh, J., Juhász, B., Komlósi, I., Jávör, A., Czeglédi, L.: Expression of
INSR and GAL is influenced by quantitative feed intake of chicken.
In: Proceedings of the 11th Central and Eastern European Proteomics Conference, Copyvair,
Košice, 92, 2017.
11. **Simon, Á.**, Mészár, Z. M., Oláh, J., Németh, J., Szilvássy, Z., Juhász, B., Komlósi, I., Jávör, A.,
Czeglédi, L.: Neuropeptides and feed intake regulation of chicken.
Annals Romanian Soc. Cell. Biol. 44, 37, 2016. ISSN: 1583-6258.





További közlemények

Magyar nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (3)

12. Csikós, Á., **Simon, Á.**, Homonai, K., Gulyás, G., Tisza, Á., Tamás, A., Reglődi, D., Jávor, A., Czeglédi, L.: Polimorfizmus keresése a szarvasmarha hipofízis adenilát-cikláz aktiváló polipeptid 5. exonjában.
Agrártud. Közl. 65, 17-20, 2015. ISSN: 1587-1282.
13. Gulyás, G., Jávor, A., Radócz, T., **Simon, Á.**, Czeglédi, L.: A tojás proteomjának frakcionálása folyadék közegben az izoelektromos pont alapján.
Agrártud. Közl. 57, 39-42, 2014. ISSN: 1587-1282.
14. Csikós, Á., **Simon, Á.**, Tisza, Á., Gulyás, G., Jávor, A., Czeglédi, L.: PCR-TTGE módszer alkalmazása DNS mutációk kimutatására.
Agrártud. Közl. 57, 21-25, 2014. ISSN: 1587-1282.

Idegen nyelvű tudományos közlemények hazai folyóiratban (1)

15. Máthé, C., Demeter, Z., Resztár, A., Gonda, S., Balázs, A., Szőke, É., Kiss, Z., **Simon, Á.**, Székely, V., Riba, M., Garda, T., Gere, B., Noszály, Z., Molnár, V. A., Vasas, G.: The plant tissue culture collection at the Department of Botany, University of Debrecen.
Acta biol. Szeged. 56 (2), 179-182, 2012. ISSN: 1588-385X.

Idegen nyelvű tudományos közlemények külföldi folyóiratban (6)

16. Gulyás, G., Pohóczky, K., Csősz, É., **Simon, Á.**, Jávor, A., Czeglédi, L.: Comparative proteome analysis of skeletal muscle between Merino and Tsigai lambs.
Small Ruminant Res. 158, 35-41, 2018. ISSN: 0921-4488.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.12.003>
IF: 0.974 (2017)
17. Kovács, Z., **Simon, Á.**, Szabó, Z., Nagy, Z., Váróczy, L., Pál, I., Csánky, E., Guttman, A.: Capillary electrophoresis analysis of N-glycosylation changes of serum paraproteins in multiple myeloma.
Electrophoresis. 38 (17), 2115-2123, 2017. ISSN: 0173-0835.
IF: 2.569
18. Gulyás, G., Csősz, É., Prokisch, J., Jávor, A., Mézes, M., Erdélyi, M., Balogh, K., Janáky, T., Szabó, Z., **Simon, Á.**, Czeglédi, L.: Effect of nano-sized, elemental selenium supplement on the proteome of chicken liver.
J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 101 (3), 502-510, 2017. ISSN: 0931-2439.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/jpn.12459>
IF: 1.607





19. Freytag, C., Pabar, S., Demeter, Z., **Simon, Á.**, Resetár, A., Molnár, A. V., Sramkó, G., Máthé, C.: Production and Characterization of Tissue Cultures of Four Crocus Species from the Carpathian Basin.
Acta Biol. Crac. Ser. Bot. 59 (2), 31-39, 2017. ISSN: 0001-5296.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1515/abcsb-2017-0009>
IF: 0.8
20. Tisza, Á., Csikós, Á., **Simon, Á.**, Gulyás, G., Jávör, A., Czeglédi, L.: Identification of poultry species using polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) and capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism (CE-SSCP) methods.
Food Control. 59, 430-438, 2016. ISSN: 0956-7135.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2015.06.006>
IF: 3.496
21. **Simon, Á.**, Tisza, Á., Csikós, Á., Jávör, A., Czeglédi, L.: Detection of pig meat, liver and lard in beef by CE-SSCP.
Poljoprivreda. 21 (1), 212-215, 2015. ISSN: 1330-7142.
DOI: <http://dx.doi.org/10.18047/poljo.21.1.sup.50>

Magyar nyelvű absztrakt kiadványok (2)

22. Tisza, Á., **Simon, Á.**, Csikós, Á., Jávör, A., Gulyás, G., Czeglédi, L.: Kapilláris elektroforézis - egyszálú konformációs DNS polimorfizmus (CE-SSCP) módszer alkalmazása a házigalamb (*Columba livia domestica*) DNS mintázatának meghatározásához.
In: Tavaszi Szél Konferencia, Eger 2015. április 10-12. : Absztraktkötet 2015, Publio Kiadó, Budapest, 42, 2015. ISBN: 9789633977026
23. **Simon, Á.**, Gulyás, G., Csikós, Á., Jávör, A., Czeglédi, L.: A szarvasmarha szőrszint befolyásoló MC1R génműtörzötök kimutatása PCR-SSCP módszerrel: [poszter].
In: XXXV. Óvári Tudományos Nap: A magyar és nemzetközi agrár- és élelmiszer-gazdaság lehetőségei : [előadások és poszterek teljes anyaga CD]. Szerk.: Schmidt R., Bali Papp Á, Nyugat-magyarországi Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Mosonmagyaróvár, , 2014. ISBN: 9789633341940

Idegen nyelvű absztrakt kiadványok (3)

24. Czeglédi, L., Gulyás, G., Csernus, B., **Simon, Á.**: Development of dna methods for the identification of food substitution by poultry species in meat and processed meat products.
In: 9th Central European Congress on Food, Food Science for Well-being. Ed.: Ovidiu Tita, "Vasile Goldis" University Press, Arad, 83, 2018. ISBN: 9786061215461
25. Demeter, Z., Resetár, A., **Simon, Á.**, Freytag, C., Pabar, S., Beyer, D., Máthé, C.: The establishing of tissue cultures and plant regeneration from *Crocus heuffelianus* and *Crocus scepusiensis*.
In: European Researchers Day, [s.n.], Tokyo, 5, 2015.





26. Csikós, Á., Tisza, Á., **Simon, Á.**, Gulyás, G., Jávör, A., Czeglédi, L.: Species identification in meat products by PCR-single strand conformation polymorphism and DNA sequencing.
In: Innovative researches for the future of agriculture and rural areas development : Vth International Scientific Symposium for PhD Students and Students of Agricultural Colleges, 18-20 September 2014 Bydgoszcz-Inowrocław, Poland, University of Technology and Life Sciences Press, Bydgoszcz, 42, 2014.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 12,731

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
3,285**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2018.07.19.

