

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

SIMON ÁDÁM LÁSZLÓ

DEBRECEN

2018.

DEBRECENI EGYETEM
ÁLLATTENYÉSZTÉSI TUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

Doktori Iskola vezető:

DR. KOMLÓSI ISTVÁN
egyetemi tanár
az MTA doktora

TÉMAVEZETŐ:

Dr. Czeglédi Levente PhD
egyetemi docens

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

Készítette:

SIMON ÁDÁM LÁSZLÓ
doktorjelölt

Debrecen

2018.

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

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az állattenyésztési tudományok tudományágban

Írta: **Simon Ádám László** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola
(Kérődzők – Állatitermék-előállítás Doktori Programja) keretében

Témavezető: Dr. Czeglédi Levente, egyetemi docens

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Kovács András, DSc
Tagok: Dr. Anton István, PhD
Dr. Csiki Zoltán, PhD

A doktori szigorlat időpontja: 2018.04.19.

Az értekezés bírálói:

név	fokozat	aláírás
Dr. Anton István	PhD
Dr. Góczy Elen	DSc

A bírálóbizottság:

	név	fokozat	aláírás
elnök:	Dr. Babinszky László	PhD
tagok:	Dr. Kusza Szilvia	PhD

titkár:	Dr. Pálfyné Dr. Vass Nóra	PhD

Az értekezés védésének időpontja: 2018.....

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1 A nem genetikai tényezők szerepe a takarmányfelvételben	11
2.2 A genetikai tényezők szerepe a takarmányfelvételben	12
2.3 Hipotalamusz, a takarmányfelvétel szabályzás központja	14
2.4 A takarmányfelvétel rövid és hosszú távú szabályzása.....	17
2.5 A vizsgálatba vont neuropeptidek	19
2.5.1 Melanin koncentráló hormon.....	22
2.5.2 Neuromedin U.....	23
2.5.3 Hipofízis adenilát cikláz aktiváló peptid	24
2.5.4 Galanin.....	25
2.6 Az mRNS kvantitálás szerepe a neuropeptideket kódoló gének vizsgálatában	27
2.6.1 qPCR.....	28
2.6.2 A normalizáció és a referenciagének	29
2.7 A patkóbél, éhbél, csípőbél morfológiai változásai a takarmánymegvonás hatására	31
2.7.1 Proteomika	33
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	34
3.1 Az állatkísérletek és a mintagyűjtés szabályozása	34
3.2 A vizsgálatba vont fajták és a kísérleti beállítások	34
3.2.1 A Tetra SL hibrid.....	34
3.2.2 A Ross 308 húshibrid.....	35
3.2.3 A kísérleti beállítások	36
3.3 Általános módszerek	38
3.3.1 Mintavétel	38
3.3.2 Vérplazma glükóz és inzulin mérések	38
3.3.3 RNS-izolálás, cDNS szintézis és qPCR.....	39
3.3.4 Fehérjeizolálás	41
3.3.5 Statisztikai elemzés.....	42
3.4 A 40%-os takarmánykorlátozás hatása a tojótípusú házityúk takarmányfelvételt szabályzó peptidjeinek és receptorainak kifejeződésére.....	43
3.4.1 Állatok és a kísérleti beállítás	43

3.4.2	PACAP-38 radioimmunesszé	43
3.4.3	Western blot	44
3.4.4	Immunhisztokémia.....	45
3.4.5	Etológiai megfigyelések	46
3.5	Stabilan kifejeződő referenciagének kiválasztása a brojlercsirke hipotalamuszában, különböző táplálóanyag-ellátottság mellett	47
3.5.1	Az irodalmi áttekintés anyag és módszere.....	47
3.5.2	Állatok és a kísérleti beállítás	47
3.5.3	A 10 referenciagén-jelölt stabilitásvizsgálata	48
3.6	A takarmánymegvonás-újraetetés és a növekedés hatása a brojlercsirke MCH gén kifejeződésére, az <i>MCHR4</i> és <i>PMCH</i> expresszió szövetek közti vizsgálata	51
3.6.1	Állatok és a kísérleti beállítás	51
3.6.2	MCH radioimmunesszé	51
3.7	A takarmánymegvonás hatása a házityúk középbelének morfológiájára és az éhbélének proteomjára	52
3.7.1	Állatok és a kísérleti beállítás	52
3.7.2	Középbél morfológiai mérések.....	52
3.7.3	A fehérjék jelölése fluoreszcens festékkel.....	53
3.7.4	Kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (2D-DIGE), képelemzés...	54
3.7.5	A fehérjék azonosítása	55
4.	EREDMÉNYEK	56
4.1	A 40%-os takarmánykorlátozás hatása a tojótípusú házityúk takarmányfelvételt szabályzó peptidjeinek és receptorainak kifejeződésére.....	56
4.2	Stabilan kifejeződő referenciagének kiválasztása a brojlercsirke hipotalamuszában, különböző táplálóanyag-ellátottság mellett	66
4.2.1	Referenciagének a házityúk génexpressziós vizsgálatokban.....	66
4.2.2	A referenciagén-jelöltek expressziós stabilitása	67
4.3	A takarmánymegvonás-újraetetés és a növekedés hatása a brojlercsirke MCH gén kifejeződésére, az <i>MCHR4</i> és <i>PMCH</i> expresszió szövetek közti vizsgálata	73
4.3.1	Az <i>MCHR4</i> és <i>PMCH</i> mRNS szöveti eloszlása, a takarmánymegvonás- újraetetés hatása a két gén expressziójára.....	73
4.3.2	Az <i>MCHR4</i> és <i>PMCH</i> kifejeződés növekedés függése, korrelációelemzés a fenotípusos paraméterekkel.....	75
4.4	A takarmánymegvonás hatása a házityúk középbelének morfológiájára és az éhbélének proteomjára	81
4.4.1	A középbél morfológiai változása	81

4.4.2	Az azonosított fehérjék	82
5.	KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK.....	92
6.	AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA	97
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	98
8.	SUMMARY.....	102
9.	IRODALOMJEGYZÉK	106
	PUBLIKÁCIÓK AZ ÉRTEKEZÉS TÉMAKÖRÉBEN	130
	MELLÉKLETEK.....	135
	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	148
	NYILATKOZAT	150

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ACTA2	aktin, simaizom típus
ACTB	béta aktin
AgRP	agouti-related peptid
ALB	albumin
APOA1-5	apolipoprotein A 1-5
B2M	béta-2-mikroglobulin
BSA	bovine serum albumin / borjú szérum albumin
CART	cocaine and amphetamine regulated transcript / kokain- és amfetamin-regulált átirat
CCK	cholecystokinin/kolecisztokinin
cDNS	komplementer DNS
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate / 3-[(3-kolamidopropil)dimetilammónio]-propánszulfonát hidrát
CHP1	Calcineurin B homologous protein 1 / calcineurin B homológ fehérje 1
Cq	quantification cycle / kvantifikációs ciklus
CRF	corticotropin releasing factor/kortikotropin felszabadító faktor
CV	coefficient of variation / variációs együttható
DAB	diamino-benzidin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole / 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroklorid
DIGE	differenciáló gélelektroforézis
DMN	dorzomediális mag
DTT	ditiotreitól
ECL	enhanced chemiluminescence / fokozott kemilumineszcencia
EDTA	etilén-diamin-tetraecetsav
EXFABP	extracellular fatty acid-binding protein / extracelluláris zsírsavkötő fehérje
GAL	galanin
GAPDH	gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz

GIT	gasztrointesztinális rendszer
GLP-1/GLP-2	glucagon-like peptide/glükagonszerű peptid
GLUT	glükóz transzporter
HMBS	hidroximetilbilán szintáz
HSP90	hősokkfehérje 90 kDa
ICV	intracerebroventrikuláris/agyüregi
IgG	immunglobulin G
IN	infundibuláris mag
INSR	insulin receptor / inzulin-receptor
IPG	immobilizált pH grádiens
IRMA	immunoradiometric assay / immunradiometrikus esszé
IV	intravénás
kDa	kilodalton
KRT14	keratin, I típus citoszkéletális 14
LBR	lamin b receptor
LH	laterális hipotalamusz
MAGT1	magnézium transzporter fehérje 1
MC1R-MC5R	melanocortin receptor 1-5 / melanokortin receptor 1-5
MCH	melanin-concentrating hormone / melanin koncentráló hormon
MCHR4	melanin-concentrating hormone receptor 4 / melanin koncentráló hormon receptor 4
MJ	megajoule
mRNS	messenger ribonukleinsav
MUC6	mucin-6
NMU	neuromedin U
NMUR1	neuromedin U receptor 1
NMUR2	neuromedin U receptor 2
NPY	neuropeptid Y
PAC1	pituitary adenylate cyclase-activating peptide receptor 1 / hipofízis adenilát cikláz aktiváló peptid receptor 1
PACAP	pituitary adenylate cyclase-activating peptide / hipofízis adenilát cikláz aktiváló peptid
PBS	phosphate-buffered saline / foszfát pufferes sóoldat

PMCH	pre-melanin-concentrating hormone / pre-melanin koncentráció hormon
POLR2B	RNA Polymerase II Subunit B / RNS polimeráz II B alegység
POMC	pro-opiomelanokortin / pro-opiomelanokortin
PVN	paraventriculáris mag
PYY	peptide tyrosine tyrosine/peptid tirozin tirozin
qPCR	quantitative polymerase chain reaction / kvantitatív polimeráz lánreakció
R	korrelációs koefficiens
RIA	radioimmunoassay / radioimmuneszé
RN18S	18S riboszómális RNS
RPS17	ribosomal protein S17 / S17 riboszómális fehérje
SD	standard deviation / szórás
SDS	sodium dodecyl sulfate / nátrium-dodecil-szulfát
SEM	standard error of the mean / az átlag közepes hibája
SNP	single-nucleotide polymorphism / egy pontos nukleotid-polimorfizmus
TBP	TATA-box binding protein / TATA-boksz kötő fehérje
TPM1	tropomiozin alfa-1
UBC	ubikvitin c
VIP	vazoaktív intesztinális peptid
VMN	ventromediális mag
YWHAZ	tyrosine 3-Monooxygenase-Tryptophan 5-Monooxygenase Activation Protein Zeta / tirozin 3-monooxygenáz - triptofán 5-monooxygenáz aktiváló fehérje zéta
α -MSH	alfa-melanocita stimuláló hormon

1. BEVEZETÉS

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 hasvízkór és keringési zavarok (hirtelen halál szindróma) gyakoribb előfordulása, valamint a csökkenő reprodukciós teljesítmény (Czeplédi és mtsai., 2013). 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 termeléshez.

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 hizlaló szakaszában (Sahraei, 2012). A 24 órás takarmánymegvonás jó lehetőséget nyújtana ahhoz, hogy a potenciális étvágy szabályzó neuropeptideket kódoló gének kifejeződését vizsgálhassuk. 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 brojlercsirke 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 brojlercsirke hasüregi zsír mennyisége korrelál-e ezen gének szintjével a hipotalamuszban? A hasüregi zsír, a testtömeg és a hasüregi zsír mennyiségéről visszajelzést adó (adipozitás) 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. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A takarmányfelvétel

A takarmányfelvétel a gazdasági állatok rendszeresen ismétlődő tevékenysége, amelynek célja az életfenntartás, a szaporodás és a növekedés folyamán felhasznált tápanyagok pótlása. A takarmányfelvétel szabályozása rendkívül összetett folyamat, amiben számos tényező játszhat szerepet. Ezen tényezőket három csoportba sorolhatjuk: környezeti tényezők, a takarmány jellemzői, az egyed genetikai tulajdonságai.

2.1 A nem genetikai tényezők szerepe a takarmányfelvételen

A környezet az egyik legfontosabb termelést alakító tényező, mert közvetlenül befolyásolja a genetikai képességek kifejeződését. A környezeti tényezők közül meg kell említeni a hőmérsékletet. A madarak esetén a hőleadást korlátozza a tollazat, valamint a verejtékmirigyek hiánya. A termoneutrális környezeti hőmérséklettől (19-27 °C) magasabb hőmérsékleten a metabolikus folyamatok által termelt hő csökkentése érdekében a madaraknak csökkenteniük kell a takarmányfelvételt (az energia bevitelt). Ettől alacsonyabb hőmérsékleten ugyan nő a takarmányfelvétel, de a többlet energia bevitele hőtermelésre fordítódik (Leeson és Summers, 2009). A környezeti tényezők között a fénynek is jelentős szerepe van a takarmányfelvétel alakulásában. A természetes fotoperiódus helyett a folyamatos megvilágítás és egy órás sötét periódus beiktatása szinte folyamatos takarmányfelvételt tesz lehetővé, ezáltal a brojlercsirkék növekedése maximalizálható. A 15 óránál rövidebb megvilágítás jelentősen csökkenti a takarmányfelvételt és a súlygyarapodást a folyamatos, vagy 23 órás megvilágítással összehasonlítva (Lewis és mtsai., 2009). Az állománysűrűség is hatással lehet a takarmányfelvételre. A 25 db/m²-t meghaladó állománysűrűség kedvezőtlen hatású a 28 és a 42 napos élősúlyra, a napi takarmányfelvételre, növeli az elhullást, és növeli a hiányos tollazatú állatok számát (Tong és mtsai., 2012; internet 2).

A takarmány összetétele is befolyásolhatja a takarmányfelvételt. A pecsenycsirkék képesek az energiaigényük szerint módosítani a takarmányfelvételüket. Alacsonyabb energiatartalmú takarmány etetésekor (11,3 vs. 13,82 AME_n MJ/kg) a takarmányfelvétel megnő a nagyobb energiatartalmúhoz képest (Leeson és mtsai., 1996). Újabb megfigyelések szerint a takarmányfelvételt befolyásoló tényező nem csak a takarmány energiatartalma, hanem más tápanyag is lehet. Például az alacsony

fehérjetartalom is limitáló tényezője a takarmányfelvételnek. Hiába megfelelő annak energiatartalma, a felvétel csökken, ha a fehérjetartalom nem elegendő. Ennek feltételezett oka, hogy a házityúk takarmányfelvételét az első limitált mennyiségben jelen lévő tápanyag, semmint a takarmány energiatartalma korlátozza (Mbajjorgu és mtsai., 2011).

A takarmány fizikai megjelenése is hatással lehet a takarmányfelvételre. A dercés takarmányból préssel pellet állítható elő. A pelletált takarmánnyal etetett pecsenyecsirkék esetén 8-13%-al nagyobb testtömeg érhető el a dercés formához képest. A nagyobb tömörség miatt nő a takarmányfelvétel, valamint a madarak kevesebb időt töltenek takarmányfelvétellel, ami az életfenntartó energiaszükségletük csökkenésével jár (internet 3; Leeson és mtsai., 1999).

2.2 A genetikai tényezők szerepe a takarmányfelvételben

A tojó- és pecsenyetípusú házityúkok között már a kelést követően is jelentős különbségek mérhetőek a takarmányfelvételben. A második napon már kétszeres a különbség (4 vs. 8 g/nap) ami nyolc napos korra eléri a háromszoros (10 vs. 30 g/nap) különbséget. A potens orexigén neuropeptid Y (NPY) intracerebroventrikuláris (ICV) injektálása mindkét fajta takarmányfelvételét növelte, illetve az anorexigén alfa-melanocita stimuláló hormon (α -MSH) injektálása mindkét fajta takarmányfelvételét csökkentette, a takarmányfelvételben mutatkozó különbségek nem magyarázhatóak a fajták esetleges különböző válaszadási képességével (Saneyasu és mtsai., 2011). A fajták közti takarmányfelvételben megmutatkozó különbségek gyakran a takarmányfelvételt szabályzó gének hipotalamikus kifejeződésben is megjelennek, mérhetőek. A két különböző fajta, a tojótípusú White Leghorn és a brojler Cobb között nem találtak expressziós különbséget az orexigén peptideket kódoló neuropeptid Y, az agouti-related peptid, a pro-opiomelanokortin az orexin, illetve leptin receptor között. Viszont a brojlercsirkék jelentősen nagyobb mértékben expresszálták az energia egyensúlyhoz és obezitáshoz köthető glukokortikoid receptort, a kortikotropin felszabadító hormont és a zsírtömeg és obezitás asszociált (FTO) gént (Yuan és mtsai., 2009).

A takarmányfelvételt szabályzó peptidek kifejeződése összefüggést mutat a testtömeggel. A hosszútávú szelekció (56 generáción át) eredményeképpen nemesítették ki a tojótípusú Virginia kis (LWS) és a nagy (HWS) élősúlyra szelektál

vonalaikat. Eredetileg ezek a vonalaknak a létrehozása 1957-ben kezdődött kísérleti céllal, az eltérő testsúly a növekedésre, reprodukcióra és az immunológiára gyakorolt hatásának vizsgálata céljából. Ezek a madarak 56 napos korukban tízszeres különbséget mutatnak az élősúlyukat tekintve (200 g a 2 kg-al szemben). A HWS vonal nagy mennyiségű takarmányfelvételre és elhízásra hajlamos, míg az LWS vonalat szélsőségesen alacsony takarmányfelvétel és megkésett ivarérés jellemzi. A kutatók 27 takarmányfelvétel szabályzásában részt vevő géntermék kifejeződését vizsgálták. A legtöbb orexigén neuropeptid nem mutatott a kifejeződését tekintve különbséget az LWS és HWS vonalak közt. Az LWS vonal egyedei nagyobb mértékben fejezték ki az anorexigén neuropeptideket, ami magyarázhatja a csoport alacsonyabb takarmányfelvételét (Yi és mtsai, 2015).

Ismert tény, hogy házityúkوك ivarspecifikus eltéréseket mutatnak a testtömeg és takarmányfelvétellel kapcsolatos teljesítmény mutatókban. A brojlerkakasok esetén a testtömeg 42 napos korra 15%-al nagyobb, mint a jércék esetén. Ez 17%-al nagyobb napi takarmányfogyasztással párosul (internet 6). Az ivarspecifikus különbségek mérhetőek bizonyos orexigén peptidek agyi expressziójában. Az orexigén agouti-related peptid (AgRP) kifejeződése jelentősen nagyobb az *ad libitum* takarmányozott Ross 308-as kakasok hipotalamuszában, mint a jércékben (Boswell és Dunn, 2017).

2.3 Hipotalamusz, a takarmányfelvétel szabályzás központja

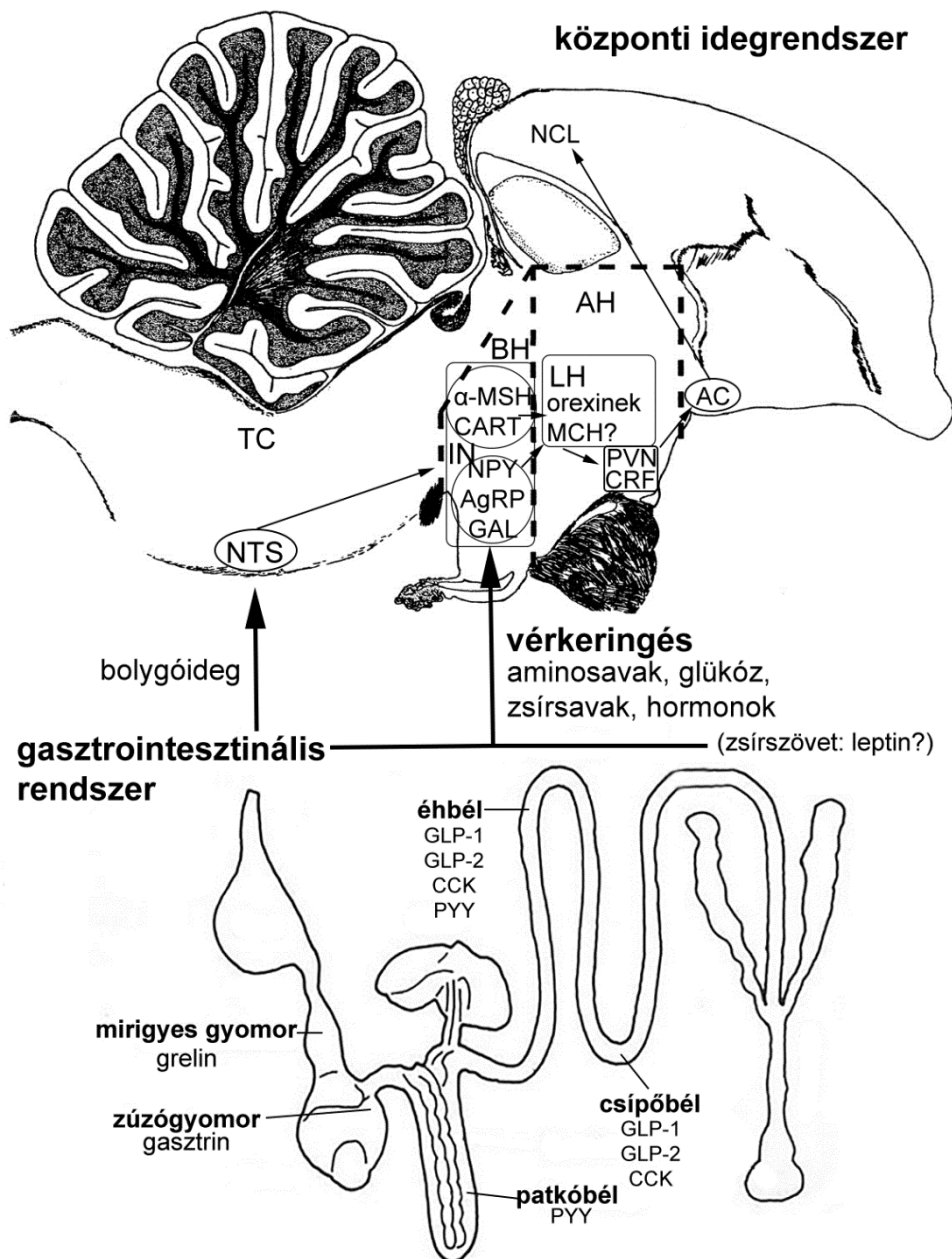
A hipotalamusz a köztiagynak a talamusz alatti részénél található, a látóideg kereszteződés (*chiasmia opticum*) rostrális végétől a szemmozgató ideg (*nervus oculomotorius*) kaudális végéig terjedő területet nevezzük. Funkciói közé tartozik az autonóm idegrendszer ellenőrzése, cirkadián ritmus szabályzása, az agyalapi mirigy hormontermelésének szabályozása, neuroszekrétumok termelése, az érzelmek (emlősök) és a magatartás kialakítása. Az étvágy szabályzásban-takarmányfelvételben betöltött szerepét közel nyolcvan éve tanulmányozzák.

A hipotalamuszban öt sejtcsoport található, amelyek az étvágy szabályzásában részt vevő orexigén (étvágyfokozó) és anorexigén (étvágycsökkentő) neuronokat tartalmaznak (Palkovits, 2003). Ezek a *nucleus dorsomedialis hypothalami* (DMN), a *nucleus infundibuli hypothalami* (IN), a *nucleus paraventricularis magnocellularis* (PVN), a *nucleus ventromedialis hypothalami* (VMN) és a *regio lateralis hypothalami* (LH). Hetherington és Ranson (1940) állapították meg először, hogy a hipotalamusz egyes területeinek sértése milyen hatást gyakorol az állatok takarmányfelvételére. A DMN, PVN és VMN magok roncsolása az állatok elhízását okozta (jóllakottság központ), a laterális hipotalamusz (LH) sértése súlyvesztéshez vezetett (éhségközpont). Később kiderült, hogy a takarmányfelvétel az étvágyközpont elméletnél összetettebb idegpályák működésére épül, amiknek legfontosabb szabályzó molekulái a neuropeptidek.

A neuropeptidek hatásukat tekintve olyan intercelluláris szignalizációs molekulák, amelyek képesek befolyásolni az idegsejtek (neuronok) aktivitását, és amelyeket általában maguk a neuronok termelnek és bocsátanak ki. Általában 3-50 aminosavból állnak. Ezzel szemben a peptidhormonokat neuroendokrin sejtek termelik, és a vérárammal jutnak el a célpontjukhoz, ami szintén lehet neuron (Le és mtsai., 2014). A hipotalamusz egyes neuronjai által termelt neuropeptidek fontos szerepet játszanak a táplálékfelvételben. A hipotalamusz alapján elhelyezkedő infundibuláris magban (IN) két, eltérő funkciójú sejtcsoportosulás található. Az IN ventromediális területének orexigén neuronjai együtt termelik az agouti-related peptidet (AgRP) és a neuropeptid Y-t (NPY), a ventrolaterális terület anorexigén neuronjai a pro-opiomelanokortint (POMC) és a kokain-amfetamin szabályzott transzkriptumot (CART) emlősök esetén (Schwartz és mtsai., 2000) és a terület funkcionális konzerváltsága miatt madarak esetén is (Phillips-Singh és mtsai., 2003). Az IN

neuronjait elsőrendű neuronoknak nevezik, mivel ezek a táplálékfelvétel regulációjának elsődleges szenzorai. Az IN elsődleges neuronjain található receptorok (kolecisztokinin [CCK], galanin, glükagonszerű peptid [GLP-1], ghrelin, inzulin és leptin) reagálnak a cirkuláló periférián termelődő peptidekre és tápanyagokra (aminosavak, glükóz, zsírsavak), ezek a szervezet rövid és hosszú távú energia ellátottságának jelzőmolekulái a vérplazmában (Denbow és mtsai., 1982; Scanes, 2014). Házityúk esetén az inzulin receptor (Shiraishi és mtsai., 2011a) lokalizációját (IN) már ismerjük. A CCK receptor (Dunn és mtsai., 2013) galanin (Józsa és Mess, 1993) GLP (Richards és mtsai., 2005), ghrelin (Sirotkin és mtsai., 2013) és a leptin (Seroussi és mtsai., 2015) receptorok hipotalamikusan kifejeződése ismert, de az még nem tisztázott azon belül melyik magcsoportban expresszálódnak. Ha a perifériás jelek alapján (2. táblázat) a szervezet energia ellátottsága, a gasztrointesztinális rendszer fizikai telítettsége nem megfelelő, az orexigén neuronok AgRP/NPY produkciója fokozódik, az α -MSH/CART-t produkáló neuronok aktivitása csökken. Az elsőrendű neuronokból projekciók indulnak a LH-ban található másodrendű neuronok felé. Mind az AgRP, mind az α -MSH képes a LH magok neuronjain található melanokortin-4 receptorhoz (MC4R) kötődni (Scanes, 2014). Az α -MSH az anorexigén projekció neurotranszmittere, az MC4R-hez kötődve aktiválja azt. Az AgRP ellentétes hatást fejt ki az MC4R-en, gátolja annak aktivációját az α -MSH kötődés gátlásával, azaz képes csökkenteni az anorexigén projekció hatásosságát (Takeuchi és mtsai., 2000). A NPY szintén a másodrendű neuronokon található Y1R receptoron keresztül fejt ki orexigén hatását. Az MC4R aktivációja olyan szignalizációs kaszkádot indít el, aminek eredményeképpen az orexineket kódoló gén és az MCH (*PMCH*) kifejeződése megnő, habár ennek egyes elemei (pl. milyen transzkripciós faktorok játszanak szerepet ezek expressziójában) még nem ismertek (Girault és mtsai., 2012; Zhang és mtsai., 2005). A másodrendű neuronok a *nucleus accumbens* felé projektálnak (motiváció kiváltása, a jutalmazás központja), majd innen a *nidopallium caudolaterale* felé (1. ábra), ami a végrehajtó és a magasabb rendű kognitív funkciók központja madarakban. A laterális hipotalamusz másodrendű neuronjaiból újabb projekciók indulnak a limbikus rendszer (jutalmazó központ, táplálkozási kedv), az agyalapi mirigy (hormonális válaszok), az agytörzs és a gerincvelő irányába, ahol a gyomor-bélrendszert és a hasnyálmirigyet irányító autonóm neuronok találhatóak (Bálint és mtsai., 2011; Husband és Shimizu, 2011; Palkovits, 2003). 48 órás takarmánymegvonás hatására olyan viselkedésbeli változások zajlanak le, mint a stresszhez köthető viselkedési minták gyakoriságának fokozódása, mint pl. a

rácsozat, a tollazat csipkedése, a társak felé irányuló agresszív csipkedés, és az ivóvízkeresés csökkenése figyelhető meg (Webster, 1995).



1. ábra: A háziyúk takarmányfelvételének szabályzásában résztvevő központi és perifériás elemek, Griffin és mtsai. (2001) és (internet 4) alapján módosítottam. AC: *nucleus accumbens*; AgRP: agouti-related peptide; AH: *anterior hypothalamus*; BH: *basalis hypothalamus*; CART: kokain- és amfetamin-regulált átirat; CCK: kolecisztokinin; CRF: kortikotropin felszabadító faktor; GAL: galanin; GLP: glükagonszerű peptide; IN: *infundibular nucleus*; LH: *lateralis hypothalamus*; MCH: melanin koncentráló hormon; α-MSH: alfa-melanocita stimuláló hormon; NCL: *nidopallium caudolaterale*; NPY: neuropeptid Y; NTS: *nucleus tractus solitarii*; PVN: *paraventricularis nucleus*; PYY: peptide tirozin tirozin; TC: *truncus cerebri*. [?]háziyúk esetén még nem írták le.

2.4 A takarmányfelvétel rövid és hosszú távú szabályzása

A takarmányfelvételnek és ezáltal a testtömeg megfelelő szintjének fenntartása rövid és hosszú távú szabályozásai folyamatokat igényel. A táplálékfelvétel az anyagcsere egyensúlyát tekintve rövid távon a pillanatnyi táplálóanyag ellátástól (jóllakottság-éhség, takarmányfelvételek között értendő), hosszú távon pedig a tápláltsági állapottól (hízottsági állapottól) függ.

A takarmányfelvétel rövid távú szabályozásának jelzései madarak esetén a GIT-ből indulnak, és anorexigén hatásúak, vagyis eddigi ismereteink szerint a takarmányfelvétel leállításáért felelősek (2. táblázat). Itt megkülönböztethetünk ingerstív (preabszorbtív) szakaszban működő szignálokat, ilyen a begy, mely ha elérte fizikai kapacitását feszülése a bolygóidegen keresztül leállíthatja a takarmányfelvételt. Tároló funkciója ellenére a kimetszett begyű házityúk takarmányfelvétele jelentősen nőtt (Denbow és mtsai., 1994). Ezzel szemben az emlősökben bizonyos peptidhormonok ellentétes hatást fejtenek ki. A takarmányfelvételt követően a házityúk mirigyes gyomrában termelődő ghrelin anorexigén, míg az emlősök gyomrából felszabaduló ghrelin orexigén hatású (Honda és mtsai., 2017). A GIT mentén termelődő peptidek a mirigyes és zúzógyomor falának mirigyeiben, a patkóbél, éhbél, csípőbél, enteroendokrin sejtek (emlősök esetén az L, I és G sejtekben azonosították) termelik. Koncentrációjuk a vérkeringésben poszt-ingerstív szakaszban (felszívási szakaszban) növekszik, éhezéskor viszont csökken. A keringéssel a központi idegrendszerben található étvágy szabályzó központba, a hipotalamuszba eljutva kötődnek a megfelelő receptorukhoz és az anorexigén peptideket (AgRP/NPY) termelő neuronokat aktiválják (1. ábra). Meg kell említeni, hogy a felszívási szakaszban a véráramba bekerülő tápanyagok (glükóz, aminosavak, zsírsavak) növekvő koncentrációja is csökkentheti a takarmányfelvételt (Scanes, 2014). A glükóz központi injekciója csökkenti a takarmányfelvételt, glükóz csatornákon keresztül (Denbow és mtsai., 1982).

A madarak az emlősökétől eltérő glükóz homeosztázissal bírnak, vérükben a keringő glükóz koncentrációja (215 mg/dl) duplája az emlősökének (ember: 100 mg/dl, patkány: 88 mg/dl) normál inzulinkoncentráció (0,6 ng/ml) mellett (Simon és mtsai., 2011). A normál inzulinszint ellenére a házityúk inzulinrezisztens állat, hiperglikémiás állapotot csak nagy inzulindózissal lehet elérni (Kato és mtsai., 2000). Molekuláris mechanizmusát tekintve az inzulin az inzulinreceptoron keresztül fejti ki hatását. Az

inzulinreceptor egy heterotetramer transzmembrán fehérje, ami két α és két β alegységből áll. Házityúk esetén a 28. kromoszómán kódolt. Eddig egyetlen receptor változatot írtak le. Molekulasúlyát tekintve az α alegység 135 kilodalton (kDa) és teljesen az extracelluláris régióban található, míg a β alegység 95 kDa molekulásúlyú transzmembrán domént tartalmaz, ami átível a citoplazmába (Simon és mtsai., 1986). Az α alegység miután megkötötte az inzulint, transzfoszforilálja a β alegységeket. Az aktivált β alegység az emlősökéhez hasonló kináz aktivitással bír (Kato és mtsai., 2000) és számos szubcelluláris célfehérje tirozin oldalláncát képes foszforilálni. Így olyan útvonalakat képes aktiválni, mint a mitogén-aktivált protein kináz kaskád, ami sejtosztódáshoz vezet (Duchêne és mtsai., 2008) vagy a foszfátidilinozitol 3-kináz útvonal, ami a glükóz transzportert kódoló gén átírásához, a glikogén szintézishez és az apoptózis gátlásához vezet. Az emlősök fő glükóz transzporterét a GLUT4 ortológját nem találták meg a házityúkban. Ennek ellenére az intravénásan (IV) bejuttatott inzulin emelkedett intracelluláris glükózkoncentrációt eredményez, ami a házityúkban is feltételezi az inzulinfüggő glükóz felvételt (Tokushima és mtsai., 2005). A naposcsirkében a közelmúltban leírt GLUT12 inzulin érzékeny glükóz transzporterként működik a vázizomban (minőségében hasonló az emlős GLUT4-hez), mivel mennyisége növekszik a citoplazma membránban inzulin injektálást követően (Coudert és mtsai., 2015). Ellenben a csirkemáj GLUT12 csatornájának kifejeződése nem változott az intravénás inzulin injektálást követően (Franssens és mtsai., 2016). Az inzulinreceptor a házityúk számos szövetében megtalálható. Kifejeződik a házityúk máj és izomszövetében (Dupont és mtsai., 1998, 2009), megtalálható a vesében (Bisbis és mtsai., 1994). Az inzulin ICV injektálása két óra múltán is csökkenti az éhezett házityúkok takarmányfelvételét a POMC, CART és CRF gének expressziójának indukálásával (Shiraishi és mtsai., 2009). A hipotalamusz infundibuláris magcsoportjában kimutatták az inzulinreceptor jelenlétét, vagyis az inzulin az orexigén/anorexigén neuronokon is kifejtheti hatását (Richards és Proszkowiec-Weglarz, 2007; Shiraishi és mtsai., 2011b).

Hosszabb távon a madarak teste a zsírszövetben lipid formájába tárolja az energiát, a liposztázis elmélet szerint a központi idegrendszer ezek állapota szerint képes a takarmányfelvételt módosítani. Az emlősök esetén a zsírraktárak állapotáról visszajelzést adó legfontosabb polipeptid a leptin. A takarmányfelvétel szabályzó központjának ad jelet a test energiaraktárainak állapotáról. A leptint elsősorban a fehér

zsírsejtek termelik. Expressziója a zsírsejtek méretével, a vér leptinszintje pedig a zsírraktárak méretével korrelál pozitívan (Havel és mtsai., 1996; Hube és mtsai., 1996). A leptinhiányos kísérleti egerek szélsőséges takarmányfelvételt és testtömeg indexet mutatnak. A leptinreceptor megtalálható a házityúk hipotalamuszának bazális területén (Liu és mtsai., 2007) és a humán leptin injektálásával a takarmányfelvétel csökkenthető, ami a receptor konzervált funkciójára utal (Denbow és mtsai., 2000). Házityúk esetén a leptin létezésére ellentmondásos eredményekkel szolgált a szakirodalom (Friedman-Einat és mtsai., 1999; Taouis és mtsai., 1998), míg korszerűbb bioinformatikai módszerekkel azonosították és klónozták a házityúk leptin génjét (Seroussi és mtsai., 2015). Kiderült, hogy a zsírszövetben alig expresszálódik, kifejeződése nem korrelál a hasüregi zsír mennyiségével a szérumminták leptin tartalma nem volt elegendő a csirke leptinreceptor aktivációjához *in vitro* kísérletekben. A kutatók feltételezik, hogy a házityúk leptin inkább helyi hatással bírhat, semmint a zsírraktárak mennyiségéről visszajelzést adó keringő hormon, mint ahogy az emlősök esetén történik.

2.5 A vizsgálatba vont neuropeptidek

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. 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 házityúk takarmányfelvételének szabályzásában eddig leírt neuropeptideket az 1. táblázat, míg a periférián termelődő és központi hatással bíró peptideket a 2. táblázat foglalja össze.

1. táblázat: A házityúk táplálékfelvételének szabályozásában résztvevő neuropeptidek

peptid	hipotalamikus lokalizáció ¹	ICV injektálás hatása a takarmányfelvételre		a takarmánymegvonás hatása a hipotalamikus expresszióra	
		hústípus	tojótípus	hústípus	tojótípus
α -MSH	IN (Gerets és mtsai., 2000)	↓ (Kawakami és mtsai., 2000; Honda és mtsai., 2012)	↓ (Honda és mtsai., 2012)	↓ (Fang és mtsai., 2014) - (Song és mtsai., 2012),	nincs adat
AgRP	IN (Mirabella és mtsai., 2004)	- (Tachibana és mtsai., 2001)	↑ (Tachibana és mtsai., 2001)	↑ (Fang és mtsai., 2014; Song és mtsai., 2012)	nincs adat
CART	DMN, IN, LH, PVN (Singh és mtsai., 2016)	↑ (Tachibana és mtsai., 2003)	↑ (Tachibana és mtsai., 2003)	- (Song és mtsai., 2012)	↓ (Cai és mtsai., 2015)
MCH	nincs adat	- (Ando és mtsai., 2000)	nincs adat	↑ (Song és mtsai., 2012)	- (Yi és mtsai., 2015)
NPY	IN (Kameda és mtsai., 2001)	↑ (Furuse és mtsai., 1997)	↑ (Kameda és mtsai., 2001)	↑ (Fang és mtsai., 2014)	- (Yi és mtsai., 2015)
Orexin A	LH (Miranda és mtsai., 2013)	- (Furuse és mtsai., 1997)	- (Katayama és mtsai., 2010)	↑ (Song és mtsai., 2012)	nincs adat
Orexin B		↓ (Furuse és mtsai., 1997)	- (Katayama és mtsai., 2010)		
PACAP-38	LH, VMN, IN (Peeters és mtsai., 2000)	nincs adat	↓ (Tachibana és mtsai., 2003)	↑ (Józsa és mtsai., 2005)	nincs adat
Galanin	IN, PVN (Józsa és Mess, 1993)	↑ (Tachibana és mtsai., 2008)	↑ (Tachibana és mtsai., 2008)	nincs adat	- (Yi és mtsai., 2015)
NMU	nincs adat	↓ (Honda és mtsai., 2015)	↓ (Kamisoyama és mtsai., 2007; Honda és mtsai., 2015)	nincs adat	
CRF	PVN (Yamada és Mikami, 1985)	↓ (Denbow és mtsai., 1999)	↓ (Denbow és mtsai., 1999)	nincs adat	↑ (Yi és mtsai., 2015)
GHRH	nincs adat	nincs adat	↓ (Tachibana és mtsai., 2015)	↓ (Fang és mtsai., 2014)	nincs adat

¹különböző madárfajokban; ↓: csökkenés; ↑: növekedés; -: nincs változás; DMN: dorzomediális mag; IN: infundibuláris mag; LH: laterális hipotalamusz; PVN: paraventriculáris mag.

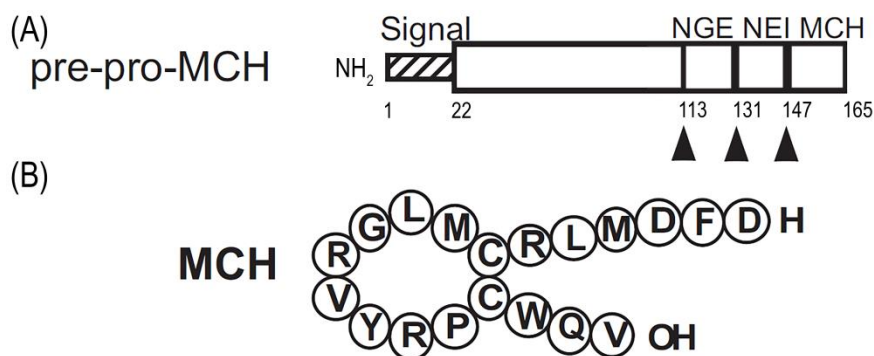
2. táblázat: A házityúk táplálékfelvételének szabályozásában résztvevő perifériás peptidhormonok

peptid	termelés fő helye	perifériás injektálás hatása a takarmányfelvételre		a takarmánymegvonás hatása a hipotalamikus expresszióra	
		hústípus	tojótípus	hústípus	tojótípus
gasztrin	zúzógyomor-antrum	nincs adat	↓(Campbell és mtsai., 1991)	- (Furuse és Dockray, 1995) ¹	- (Reid és Dunn, 2018)
glükagon-szerű peptid 1	éhbél, csípőbél	nincs adat	- (Tachibana és mtsai., 2003)		nincs adat
glükagon-szerű peptid 2	éhbél, csípőbél	↓ (Honda és mtsai., 2015)	nincs adat		
ghrelin	mirigyes gyomor	↓ (Geelissen és mtsai., 2006)	- (Kaiya és mtsai., 2007)	↑ (Richards és mtsai., 2006)	↑ (Kaiya és mtsai., 2007)
kolecisztokinin	éhbél, csípőbél	↓ (Covasa és Forbes, 1994)	↓ (Rodriguez-Sinovas és mtsai., 1997)	nincs adat	- (Reid és Dunn, 2018)
peptid tirozin-tirozin	patkóbél, éhbél	↓ (Aoki és mtsai., 2017)	nincs adat	↓ (Aoki és mtsai., 2017)	nincs adat

↓: csökkenés; ↑: növekedés; -: nincs változás; ¹a típust nem közölték

2.5.1 Melanin koncentráló hormon

A melanin koncentráló hormont (MCH) Kawauchi és mtsai. (1983) izolálták először a ketalazac (*Oncorhynchus keta*) agyalapi mirigyéből és kezdetben a halak mimikrihez szükséges bőrszín változásával hozták összefüggésbe. Később kiderült, hogy az MCH jelentős szereppel bír az emlősök táplálékfelvételének szabályzásában. Az MCH vagy a melanin koncentráló hormon 1 receptor (MCHR1) hiányos egereket hipofágia, alacsonyabb élősúly és hiperaktivitás jellemzi a kontroll egyedekhez képest (Shimada és mtsai., 1998). Azt MCH-t kódoló pro-melanin koncentráló hormon gén (*PMCH*) és az MCH receptorok expressziója főleg a központi idegrendszerre korlátozódik, azon belül is a hipotalamusz másodrendű neuronjaira (Bittencourt és mtsai., 1992), de elenyésző perifériás kifejeződést is leírtak már emlősök (Saito és mtsai., 1999) és házityúk esetén is (Cui és mtsai., 2017). Az MCH jelenlétét a véplazmában szintén leírták (Naufahu és mtsai., 2017), de még nem tisztázott milyen szerepe lehet a keringésben. A prekursor mRNS és pro-MCH peptid szerkezetét és érési folyamatát Presse és Nahon (2013) foglalta össze. Az érett MCH egy ciklikus peptid, két cisztein oldalláncát diszulfid híd köti össze, ami nélkülözhetetlen a hatásának kifejtéséhez (2. ábra). A peptid végleges formája proteolitikus hasítással jön létre a pro-MCH előalakból két másik neuropeptiddel egyetemben. Emlősök esetén egy további neuropeptid is létrejöhet alternatív kihalás eredményeként (Presse és Nahon, 2013), ám ezeket még házityúk esetén nem írták le (2. ábra). A házityúk pro-MCH szekvenciája 163 aminosavból áll és relatíve kis szekvencia hasonlóságot mutat az emlős párjával (Sun és mtsai., 2013). Ugyanakkor az érett MCH 19 aminosava nagyfokú konzerváltságot mutat a gerinces fajok között: az ember, a patkány és a házityúk MCH peptid 100% szekvencia egyezést mutat (Breton és mtsai., 1993; Cui és mtsai., 2017).



2. ábra: Az MCH peptid előalakja (A) és az érett MCH peptid szekvenciája (B) (Presse és Nahon, 2013 alapján). MCH: melanin koncentráló hormon; NEI: neuropeptid(N)-glutaminsav(E)-izoleucin(I); NGE: neuropeptid(N)-glicin(G)-glutaminsav(E); Signal: szignál szekvencia; ▲: peptidáz hasítási hely.

A *PMCH* gén variációi gyakran előnyös asszociációt mutatnak a háziállatok értékmérő tulajdonságaival. A *PMCH* promóter régiójában leírtak egy olyan egy pont nukleotid-polimorfizmust, ami asszociációt mutat a szarvasmarha féltest faggyú mennyiségével (Helgeson és Schmutz, 2008), illetve a vágott féltest súlyával és a bőralatti faggyú mennyiségével (Walter és mtsai., 2014). Házityúk esetén is leírtak olyan polimorfizmusokat a gén nem-kódoló régiójában, ami előnyös asszociációt mutat a mell- és a combhús szakítószilárdságával (Sun és mtsai., 2013), valamint sertések esetén a hátszalonna vastagságával (Perez-Montarelo és mtsai., 2014). Az MCH hatását kettő, G fehérjével kapcsolt receptoron fejt ki az emlősök esetén. Ezek az MCHR1 és az MCHR2. Feltételezik, hogy hét különböző MCH receptor található a gerincesekben (Yu és mtsai., 2015). Cui és mtsai. (2017) klónozták és jellemezték először a két MCH receptort házityúkban. Valószínűnek látszik, hogy az MCHR2 egy pszeudogén, mivel nem kódol teljes receptort, továbbá a funkcionális vizsgálatuk rámutatott, hogy az MCHR1 (MCHR4-nek nevezték az evolúciós eredete alapján) az MCH₁₋₁₉ peptidnek az egyetlen működőképes receptora házityúk esetén (Cui és mtsai., 2017).

2.5.2 Neuromedin U

A neuromedin U (NMU) peptid 25 aminosavból áll. Madarak esetén a házityúk vékonybeléből izolálták először. A szekvenált peptid C-terminális 18-25. aminosavai nagyfokú konzerváltságot mutatnak a gerinces fajok között. A biológiai aktivitásáért ez a szekvencia a felelős (Domin és mtsai., 1992). Az NMU emlősök esetén egy 174 aminosav hosszúságú prekurzorból hasítódik ki, aminek C-terminusán található az NMU peptid. Annak ellenére, hogy madarakban a peptidet már több mint húsz éve

leírták, relatíve keveset tudunk az NMU élettani hatásáról. Az NMU a G-fehérjével kapcsolt, 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptorain hat, ezek az NMUR1 és NMUR2 (Howard és mtsai., 2000). A két receptor különböző szövetek közti kifejeződését vizsgálva megállapították, hogy az NMUR1 főleg a gasztrointesztinális rendszer területén, míg az NMUR2 csak bizonyos agyi régiókban fejeződik ki (Austin és mtsai., 1995). NMU receptorok eloszlása arra enged következtetni, hogy az NMU központi és perifériás hatásokkal is bírhat. A két receptor funkcionális vizsgálata felfedte, hogy az NMU megemeli az intracelluláris kalcium szintet (Yamamoto és mtsai., 2011). Az NMU hipotalamikus lokalizációját jelenleg még nem írták le házityúkban. Az NMU agyi injektálásának hatását a házityúk különböző típusainak takarmányfelvételére az 1. táblázat mutatja be.

2.5.3 Hipofízis adenilát cikláz aktiváló peptid

A hipofízis adenilát cikláz aktiváló peptidet (PACAP) juh hipotalamuszából izolálták először. Két formáját írták le (PACAP-27 és PACAP-38), melyek a szekretin/glükagon/vazoaktív intesztinális peptid (VIP) család tagjai (Miyata és mtsai., 1989). A PACAP egy multifunkciós polipeptid, mely számos szervben megtalálható és változatos élettani folyamatban leírták szerepét (Hiramatsu és Yamasaki, 2009; Juhász és mtsai., 2015; Rácz és mtsai., 2010), szerkezete erősen konzervált a gerincesekben (Yasuhara és mtsai., 1992). Az utóbbi évtizedekben a központi és perifériás idegrendszer fejlődésében és sejtelhalást gátló funkciói miatt vált aktívan kutatott molekulává (Shioda és mtsai., 2006) Radioimmunoesszés (RIA) vizsgálata során kiderült, hogy az emberhez hasonlóan nagy koncentrációban jelen van a kérődző állatok tejében, ezáltal szerepet játszhat az újszülött szöveteinek növekedésében és differenciálódásában. A PACAP étvágy szabályzó hatását a kortikotropin felszabadító faktor (CRF) tartalmú neuronok aktiválásával fejt ki a házityúkban is (Tachibana és mtsai., 2003). Receptora (PAC1-R) megtalálható a tejmirigyekben, így feltételezhetően a tejmirigyek fejlődését is befolyásolja (Czeglédi és mtsai., 2011). Radcliff és mtsai. (2001) bizonyították elsőként, hogy a PACAP-38 az agyalapi mirigy növekedési hormon felszabadulását is modulálja: holstein tinók agyába injektálva 3 µg/testtömeg kg koncentráció felett kétszeresére emelte a növekedési hormon szérumszintjét. A PACAP-38 a növekedési hormont felszabadító hormonnal és szomatostatinnal együtt szabályozza a plazma növekedési hormon szintjét, így jelentős hatással bírhat a tejelő szarvasmarha és más kérődzők tejtermelésére, valamint az újszülött állat testfejlődésére

egyaránt. A PACAP-38 koncentrációja cirkadián ritmus szerinti oszcillációt mutat a tyúkagy és retina szöveteiben. Hasonlóan, a PACAP receptor is eltérően expresszálódik a napi ciklus folyamán (Józsa és mtsai., 2001). Éheztetett egerek agyába közvetlenül bejuttatva dóziszfüggő módon csökkenti a táplálékbevitelt, a POMC neuronokon is megtalálható receptorához kötődve jelentősen növeli az α -MSH bioszintézisét és felszabadulását (Zheng és mtsai., 2005). Anorexigén hatását tehát a melanokortin rendszeren keresztül fejt ki (Begrache és mtsai., 2011; Mounien és mtsai., 2009). A PACAP hipotalamuszon belüli lokalizációját az 1. táblázat foglalja össze. A PACAP és a receptorát kódoló *PACAP*, illetve *ADCYAP1R1* gének polimorfizmusai és azok értékmérő tulajdonságokra gyakorolt lehetséges hatásait, RuiJie és mtsai. (2010) vizsgálták a qinchuan szarvasmarha esetén. A *PACAP* génjének leírták egy olyan aminosavcserét okozó variánsát, ami előnyös asszociációt mutat a testhosszal, a marmagassággal, a testsúllyal, a szív kerületével és tömegével.

2.5.4 Galanin

A galanin (GAL) egy 29 aminosavból álló peptid, amit először a sertés középbeléből izolálták (Tatemoto és mtsai., 1983). A központi idegrendszerben a galanin immunoreaktív neuronok főleg a hipotalamuszban és a kaudális agytörzsben találhatóak meg (Józsa és Mess, 1993). A házityúk perifériás szerveiben eddig a trachea epitéliumában és a vese velőállományának sejtjeiben írták le, ahol együtt expresszálódik a neuropeptid Y-nal és a vazóaktív intesztinális peptiddel (Luts és mtsai., 1989, Zentel és mtsai., 1990). A galanin eltérő mértékben expresszálódik a házityúk nemileg dimorf agyterületein, ami arra enged következtetni, hogy a takarmányfelvételen túl szerepe lehet az ivarspecifikus viselkedés kialakításában, valamint a tojásrakás szabályzásában, mivel tojásrakás után fokozott galanin immunoreaktivitást mértek házityúk hipotalamuszában (Klein és mtsai., 2006).

NMU (<i>Anas platyrhynchos</i>)	YKVDEDLQGAGGIQSRGYFFFRPRN
NMU (<i>Bos taurus</i>)	---DEEFQGPPIASQSRRYFLFRPRN
NMU (<i>Capra hircus</i>)	---DEEFQGPPIASQSRRYFLFRPRN
NMU (<i>Equus caballus</i>)	FKVDEELQGPFPESQSRRYFLFRPRN
NMU (<i>Gallus gallus</i>)	YKVDEDLQGAGGIQSRGYFFFRPRN
NMU (<i>Meleagris gallopavo</i>)	YKVDEDLQGAGGIQSRGYFFFRPRN
NMU (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	--VDEEFQSPFGSRSGYFLFRPRN
NMU (<i>Ovis aries</i>)	---DEEFQGPPIASQSRRYFLFRPRN
NMU (<i>Sus scrofa</i>)	FKVDEEFQGPPIVSQNRRYFLFRPRN
	* * * * * * * * * * *
GAL (<i>Anas platyrhynchos</i>)	GWTLNSAGYLLGPHAVDNHRFSFDKKGFT
GAL (<i>Bos taurus</i>)	GWTLNSAGYLLGPHALDSHRSFQDKHG--
GAL (<i>Capra hircus</i>)	GWTLNSAGYLLGPHAIIDNHRSFHDKHG--
GAL (<i>Equus caballus</i>)	GWTLNSAGYLLGPHAIIDNHRSFHDKHG--
GAL (<i>Gallus gallus</i>)	GWTLNSAGYLLGPHAVDNHRSFNDKKGFT
GAL (<i>Meleagris gallopavo</i>)	GWTLNSAGYLLGPHAVDNHRSFNDKKGFT
GAL (<i>Ovis aries</i>)	GWTLNSAGYLLGPHAIIDNHRSFHDKHG--
GAL (<i>Sus scrofa</i>)	GWTLNSAGYLLGPHAIIDNHRSFHDKYG--
	***** * * * * * *
MCH (<i>Anas platyrhynchos</i>)	DFDMLRCMLGRVYRPCWQV
MCH (<i>Bos taurus</i>)	DFDMLRCMLGRVYRPCWQV
MCH (<i>Equus caballus</i>)	DFDMLRCMLGRVYRPCWQV
MCH (<i>Gallus gallus</i>)	DFDMLRCMLGRVYRPCWQV
MCH (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	DFDMLRCMLGRVYRPCWQV

PACAP (<i>Anas platyrhynchos</i>)	HIDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKN
PACAP (<i>Bos taurus</i>)	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKN
PACAP (<i>Capra hircus</i>)	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKN
PACAP (<i>Equus caballus</i>)	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKN
PACAP (<i>Gallus gallus</i>)	HIDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKN
PACAP (<i>Meleagris gallopavo</i>)	HIDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKN
PACAP (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKN
PACAP (<i>Ovis aries</i>)	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKN
PACAP (<i>Sus scrofa</i>)	HSDGIFTDSYSRYRKQMAVKKYLAAVLGKRYKQRVKKN
	* *****

3. ábra: A vizsgálatba vont neuropeptidek aminosav szekvencia illesztése (amennyiben rendelkezésre állt) különböző háziállatok esetén, * teljes aminosav egyezést jelöl.

2.6 Az mRNS kvantitálás szerepe a neuropeptideket kódoló gének vizsgálatában

A genetikai információ áramlását különböző makromolekuláris (DNS→RNS→fehérje) szinteken tanulmányozhatjuk. Az mRNS expressziós vizsgálatok nagy előnye, hogy a vizsgált célgénre magunk tervezhetjük meg a próbákat (qPCR esetén a primereket, *in situ* hibridizáció, ill. northern blot esetén az RNS, DNS próbákat), így gyakorlatilag minden ismert szekvenciájú, a kísérlet szempontjából releváns célgént vizsgálatba vonhatunk. A fehérjeszintű vizsgálatokhoz (pl. western blot relatív, vagy ELISA abszolút kvantitáláshoz) antitestek a kereskedelmi forgalomban legtöbbször nem állnak rendelkezésre házityúk esetén. A neuropeptidok nagyfokú konzerváltsága, vagyis a nagyfokú aminosav szekvencia hasonlóság elméletben lehetőséget adna elérhető emlős neuropeptidok ellen termeltetett antitestek használatára házityúk mintákhoz. Ebben az esetben azok specificitása jelenthet újabb problémákat. A neuropeptidok általában kis mértékben fejeződnek ki és mivel fehérje amplifikációs módszerek még nem léteznek, gondot okoz a kimutatási határ (fmol-nmol koncentráció). A peptidomika tudománya még kialakulóban van és számos technikai akadályt kell leküzdenie, továbbá rutinszerűen még kevés kutatóhely foglalkozik a témával (Le és mtsai., 2014).

2.6.1 qPCR

A valós-idejű polimeráz láncreakciót (qPCR) Higuchi és munkatársai (1992) dolgozták ki, a klasszikus végpontos polimeráz láncreakció (PCR) továbbfejlesztéseként, fluoreszcens nukleinsav festéket használva. A módszer széleskörűen alkalmazható az agrár alap- és alkalmazott kutatásokban génexpresszió analízisre, genetikailag módosított élőlények azonosítására, élelmiszerek eredetvizsgálatára, egy pontos nukleotid-polimorfizmus (SNP) genotipizálásra, allél megkülönböztetésre, vagy vírusterheltség mérésére akár növény- vagy állatorvosi vizsgálatok esetén is (Kuchipudi és mtsai., 2012; Taverniers és mtsai., 2003). A transzkriptomikai módszerek, mint az RNS-Seq vagy mikro-array megjelenése ellenére a qPCR továbbra is fontos eszköze az olyan alapkutatásoknak, ahol néhány, általunk választott gén kifejeződésének vizsgálatát szeretnénk elvégezni, ám a célgének száma limitált szemben az omikai módszerekkel (Kubista, 2007). A módszer előnye más mRNS kvantitálásra alkalmas metodikákkal összehasonlítva (pl. northern blot, *in situ* hibridizáció) az érzékenysége (elméletileg egyetlen kópia detektálását is lehetővé teszi), a reakciókinetika valós-idejű nyomon követése, ami mennyiségi mérést tesz lehetővé szemben a hagyományos végpont detektáló PCR-val. A módszer sebessége elérheti akár a 40 percet a legkorszerűbb PCR gépekben és nagy az áteresztőképessége (96 vagy 384 reakció elvégzése van lehetőség egyszerre). A valós-idejű PCR abszolút és relatív mérések kivitelezését teszi lehetővé. Az abszolút mennyiségi meghatározás alatt azt a mérési eljárást értjük, amikor pontosan ismerjük a kalibrátorként szolgáló cél nukleinsav koncentrációját vagy kópiaszámát és ehhez hasonlítjuk a vizsgálni kívánt ismeretlen mintánkat (kalibrációs vagy más néven sztenderd sort felhasználva), ebben az esetben abszolút mérést végzünk. A mérésünk végeztével a vizsgált mintában a cél nukleinsav mennyiségéről valamilyen dimenzióval rendelkező számot kapunk pl.: 5 ng/ml, 28 kópia/mg szövet stb. Hátránya, hogy a mérés pontossága teljes mértékben a sztenderd pontosságától függ. Az abszolút kvantitáláshoz a sztenderd létrehozása, a pontos koncentrációjának meghatározása és stabilitásának biztosítása a hosszabb tárolás és az újrafelolvasztások miatt problémát jelenthet, valamint használata a mérés költségét megnöveli (minden mérésnél alkalmazni kell).

Az alapkutatásban általában nincs jelentősége annak, hogy abszolút mennyiségi információt szerezzünk az általunk választott célgénekről. Sokkal inkább fontos, hogy e

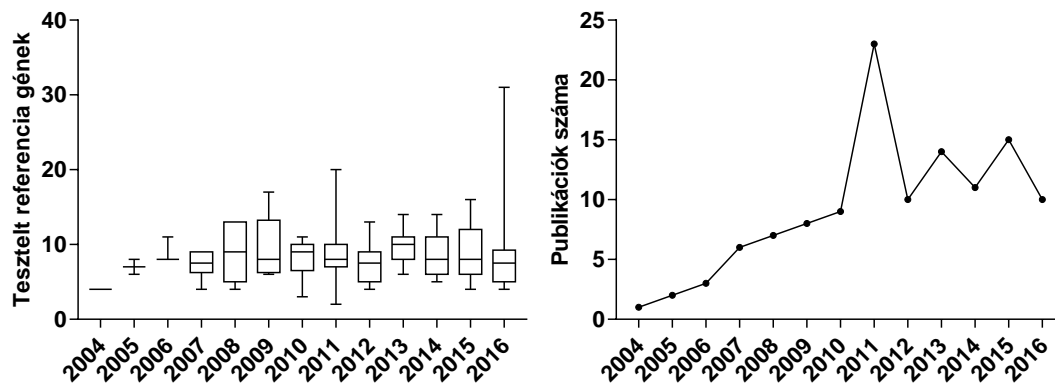
gének kifejeződésének pontos arányát megismerjük a kontroll és kísérleti csoportok között. Ezt nevezzük relatív kvantitálásnak. Ennek végső eredményeként egy dimenzió nélküli számot kapunk pl. egy célgén 2,7-szeres expressziós különbséget mutatott a kísérleti csoportban a kontroll csoporthoz képest.

2.6.2 A normalizáció és a referenciagének

A qPCR elengedhetetlen eszköze a génexpressziós kísérleteknek. Használatával közelebb kerülhetünk a gének, az állat fejlődése vagy bizonyos kísérleti körülményekre adott válaszához megértésében. Általában a már 30-50%-os statisztikailag szignifikánsnak ítélt génexpressziós különbség biológiailag is jelentősnek mondható (McCarthy és Smyth, 2009). Ahhoz, hogy ezeket a kis különbségeket megbízhatóan kvantitáljuk minimalizálnunk kell a mérésünket terhelő variabilitást. A génexpressziós adatainkat terhelő variabilitása kétféle forrásból eredhet. Az egyik a valódi biológiai variabilitás, genetikai és környezeti okokból egyazon faj egyedei némileg különböző választ adhatnak a kísérleti körülményekre. A második forrást technikai eredetű tényezők befolyásolják. A kísérletet végző személy technikai hibákkal terheli a qPCR eredményeket. Ezek más-más forrásokból származhatnak: különbségek a kiindulási mintamennyiségben, a totál RNS-izolálás kihozatalában, az RNS integritásában, az átírt RNS mennyiségében a komplementer DNS (cDNS) szintézis hatékonyságában és magában a qPCR esszében is (pipettázási hibák stb.). Ha nem próbáljuk meg korrigálni a technikai hibákból adódó variabilitást, akkor a valódi expressziós különbségek rejtve maradhatnak. A technikai hibák kiküszöbölésére különböző úgynevezett normalizációs módszereket használhatunk. Ilyen lehet, ha biztosítjuk az azonos kiindulási mintamennyiséget, vagy ha azonos mennyiségű totál RNS-t írunk át cDNS-é mindegyik mintánkból (Hugget és mtsai., 2005). Ezen megközelítések hátránya, hogy nem képesek korrigálni a pipettázási hibából adódó technikai variabilitást.

A referenciagének olyan normalizációhoz használatos gének, amik szekvenciájukat tekintve eltérnek a célgéntől, de mennyiségüket azzal együtt kvantitáljuk. A referenciagének (régebben háztartási gének) általában olyan gének, amik termékei esszenciális részét képezik a sejtéleti folyamatoknak. A qPCR munkafolyamat során a referenciának használatos géneket ugyanazok a hatások érik (mennyiségüket tekintve ugyan olyan mértékű technikai hibák terhelik), mint a kvantitálni kívánt célgénünket (Kozera és Rapacz, 2013). Ezért a qPCR mérés

végeztével a technikai hibák által okozott C_q értékekben megmutatkozó különbségek korrigálása használhatóak (Nolan és mtsai., 2006). Alkalmazásuknál alapkövetelmény, hogy maga a kísérleti hatás ne legyen befolyással a kifejeződésükre. A qPCR metodika jeles szakértőinek 2009-ben megjelent közös publikációja ajánlásokat közöl a módszerrel mért génextpressziós adatok megbízhatóságának növelése érdekében (Bustin és mtsai., 2009). Ebben többek között felhívják a figyelmet arra is, hogy a referenciagének stabilitását azok használata előtt kísérletesen igazolni kell. A háziállatokat célzó kutatásokban is egyre nagyobb figyelmet kap a megfelelő referenciagének kiválasztása (4. ábra), évről-évre nő a megfelelő referenciagén(ek) kiválasztását célzó publikációk száma. A háziállatokkal kapcsolatosan azonban elenyésző számú dolgozat jelent meg napjainkig (3. táblázat).



4. ábra: A tesztelt referenciagének átlagos száma a haszonállatokat célzó publikációkban (bal) és a témában megjelent közlemények az elmúlt 13 évben (jobb). A doboz ábra az interkvartilis értékeket (25-75%), valamint a mediánt, a hibasávok a minimum és maximum értékeket jelölik (az ábra az 1. melléklet alapján készült).

3. táblázat: Referenciagének stabilitását célzó vizsgálatok házityúk esetén

minta	körülmény	legstabilabb	leginstabilabb	vizsgálva (db)	
négy különböző szövet	szövetek közti összehasonlítás	<i>RPL32</i>	<i>YWHAZ</i>	5	Bagés és mtsai. (2015)
limfoid szervek	szövetek közti összehasonlítás	<i>TBP</i>	<i>B2M</i>	7	Borowska és mtsai. (2016)
vér	lipopoliszacharid gyulladásozó modell	<i>UB</i>	<i>ACTB</i>	5	De Boever és mtsai. (2008)
kilenc különböző szövet	bronchitis vírus-fertőzés	<i>UB</i>	<i>ACTB</i>	5	Fan és mtsai. (2012)
hémirigy és lép	bronchitis vírus-fertőzés	<i>TBP</i>	<i>ALB</i>	10	Khan és mtsai. (2017)
tüdősejtek	influenza vírus-fertőzés	<i>RN18S</i>	<i>ACTB</i>	3	Kuchipudi és mtsai. (2012)
mellizom	lizin takarmány-kiegészítés	<i>HMBS</i>	<i>UBC</i>	13	Nascimento és mtsai. (2015)
embrió fibroblaszt	madár leukózis vírusfertőzés	<i>RPL30</i>	<i>B2M</i>	11	Yang és mtsai. (2013)
embrió fibroblaszt	H5N1 fertőzés	<i>YWHAZ</i>	<i>ALB</i>	11	Yue és mtsai. (2010)
embrió fibroblaszt	Newcastle vírus-fertőzés	<i>ACTB</i>	<i>SHDA</i>	8	Yin és mtsai. (2011)

2.7 A patkóbél, éhbél, csípőbél morfológiai változásai a takarmánymegvonás hatására

A házityúk gasztrointesztinális rendszerének leghosszabb gyomor után következő része a középbél. Ennek első szakasza a patkóbél (*duodenum*) ami patkószerűen veszi körbe a hasnyálmirigyet. Első harmadába nyílik az epevezeték. Az éhbél (*jejunum*) a középbél leghosszabb szakasza, a Meckel-divertikulum határolja (ami a szikhológ maradványa). A következő szakasz a csípőbél (*ileum*), ami az ileo-cecális csatlakozásig tart. A béltartalom átlagosan sorra 10, 84 és 97 percet tartózkodik az egyes említett szakaszokon. A középbél a tápanyagok felszívására specializálódott szerv. A felszívást tekintve a glükóz legnagyobb részt a középbél patkóbél szakaszán szívódik fel. Az aminosavak legnagyobb része szintén a középbélben szívódik fel, kérdéses azonban melyik szakaszán. A zsírsavak az éhbél disztális szakaszán és az ileum kezdetén szívódnak fel. A vitaminok elsősorban a patkóbélben szívódnak fel (Scanes, 2014).

A középbél négy szövetrétegből áll, ez a lumentől kezdve sorra a mukóza, a szubmukóza (kötőszövet a mukóza és az izomréteg között), a simaizomréteg és végül a szerózus réteg. A mukóza ujjszerű kitüremkedései a felszívásért felelős bélbolyhok

(villusok). Ezek a Lieberkühn-kriptákkal folytatódnak, itt a kiválasztó működést végző sejtek, valamint a mukóza megújulását végző őssejtek találhatóak. A középbél epitélium egy dinamikus változó struktúra, a villusok folyamatosan regenerálódnak, 4 nap alatt megújulnak. A házityúk kikelés után még fejletlen középbél mukózával rendelkeznek. A kikelés után a lipidgazdag szikhólyag csak napok múlva szívódik fel teljesen. Azonban a kikelést követő 32-48 óránál tovább éhezett brojlerek teljesítménye csökkent azokhoz az egyedekhez képest, amelyek 24 órán belül takarmányt kaptak (Bhanja és mtsai., 2010). Ez a teljesítménycsökkenés a középbél szövetretegek megkésett fejlődésének is betudható. Takarmánymegvonás hatására mind a villusok felülete, a villusonkénti kripták száma, a kripták mélysége, mind pedig az osztódásban lévő sejtek száma csökken az éhezett egyedekben, mind a három középbél szakaszán az *ad libitum* egyedekhez képest. Továbbá mind a három középbél szakasz hossza is rövidülést mutatott (Geyra és mtsai., 2001; Gonzales és mtsai., 2003). A középbél epitélium dinamikus változását figyelték meg több napon át éheztetett tojótípusú tyúkokon. Újraetetés követően egy nappal a morfológiai paraméterek visszatérnek a kontroll állapotban mért értékekhez, ezzel is jelezvén a középbél epitélium gyors változását az adott takarmányozási állapotra (Yamauchi és mtsai., 1996).

2.7.1 Proteomika

A proteomikai módszerekkel lehetőségünk nyílik a kísérlet hatására lezajló összes fehérje mennyiségbeli változásának feltárására. A genomika (teljes örökítőanyag vizsgálata) analógiáján a proteomika (összes fehérje vizsgálata) elnevezést James (1997) vezette be. A proteomika célja, hogy a kísérleti körülmények hatására bekövetkező, eddig ismeretlen vagy nem várt fehérje expressziós változásokat megismerjük, ezáltal teljesebb képet kaphatunk a sejtben lejátszódó folyamatokról. Ennek ötlete már több mint negyven évvel ezelőtt felmerült. A kétdimenziós poliakrilamid gélelektroforézis módszer kidolgozása O'Farrell Joachim nevéhez fűzhető (1975). A módszer nagy felbontóképességét a fehérjék izoelektromos fókuszálása és az azt követő méretbeli elválasztásának kombinálása rejti. Az elmúlt évtizedekben jelentős technikai újítások segítették a módszer reprodukálhatóságának, a kvantitálás pontosságának és az érzékenységének javulását. Az egyik legjelentősebb, a fluoreszcens festékek bevezetése volt (Ünlü és mtsai., 1997), amivel létrejött a kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (2D-DIGE). A módszer során egy gélben futtatjuk a kontroll és a kezelt csoport egy-egy mintáját, valamint a belső sztenderdet, ami az összes kísérleti minta elegye. A futtatásokat követően a géleket digitalizáljuk, szoftveresen elemezzük. A szignifikáns különbségeket mutató fehérje foltokat azonosítjuk, kivágjuk a gélből, majd tömegspektrométer (MS) segítségével azonosítjuk. A 2D-DIGE módszerrel csökkenthetjük a gélek közti különbségeket (technikai variabilitás), a párhuzamos futtatások elhagyhatóak a hagyományos 2D módszerrel szemben, ahol a mintánkénti legalább három technikai ismétlés használata elvárt. Összességében kisebb biológiai különbségeket tudunk pontosabban kvantitálni, kevesebb labormunka árán.

A fontos metodikai fejlesztések ellenére a módszerrel továbbra is problémás a szélsőségesen savas vagy bázikus, a hidrofób, valamint a túl nagy vagy túl kis molekulatömegű fehérjék elválasztása. A 2D módszerrel a peptidóm vizsgálata nem lehetséges. A peptidok általában 10 kDa-nál kisebb molekulatömegűek, amik elválasztása és megjelenítése a poliakrilamid gélen problémákba ütközik (Magdeldin és mtsai., 2014). Jelenleg még kevesebb mint egy tucat közlemény foglalkozik a házityúk proteomikai vizsgálatával a fentebb jellemzett módszerrel (Doherty és mtsai., 2004; Gulyás és mtsai., 2017). A házityúk közepbelének proteomikai vizsgálata közelebb vihetne az éhezés hatására történő szövettani változások megértéséhez.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Az állatkísérletek és a mintagyűjtés szabályozása

A madarakat a 40/2013. (II. 14.) állatkísérletekről szóló törvény szerint, taglózással termináltam. A kísérleteket a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottság (DEMÁB) a DEMÁB/12-7/2015 regisztrációs számon jóváhagyta (2. melléklet).

3.2 A vizsgálatba vont fajták és a kísérleti beállítások

3.2.1 A Tetra SL hibrid

Származását tekintve a Tetra SL bábolnai előállítású hibrid. Nemzetközileg is jelentős tojóhibridként tartják számon. Népszerűsége a magas tojástermelési teljesítményének, a kitűnő tojásminőségének és a rendkívüli ellenálló képességének köszönheti. A magyar fogyasztói igényeket kielégítve barna tojánhéjú árutojások termelésére tenyésztették ki. Genetikai kialakulása a fehér rhode island anyai vonalaiból és a vörös rhode island apai vonalaiból történt. Külleme szerint tollazata túlnyomóan vörös, a farktollak végén fehér színeződéssel. A tojók színesek, míg a kakasok fehér színűek. Jó technológiai tűrőképességű, vérmérsékletét tekintve nyugodt állat. A kifejlett madár testtömege 2,0-2,3 kg. Genetikai eredetéből adódóan hajlamos a takarmány túlfogyasztásra, elzsírosodásra, minek következtében nagyobb a létfenntartó és termelő takarmányszükséglete, mint a leghorn eredetű hibrideknek, de a takarmányok kismértékű beltartalmi változására kevésbé érzékenyen reagál. Tojástermelése típusának megfelelő, a tojások nagysága, héjszilárdsága szintén jó. Életképessége kitűnő, a felnevelés alatti kiesés alacsony (internet 5). A Tetra SL hibridekkel végzett kísérlet beállítását az 5. ábra szemlélteti.



3.2.2 A Ross 308 húshibrid

A világ egyik legelterjedtebb húshibridje. A hazai hústermelésben is az egyik legjelentősebb szereppel bíró hibrid, a piacot 71%-ban a Ross 308 hibrid uralja.

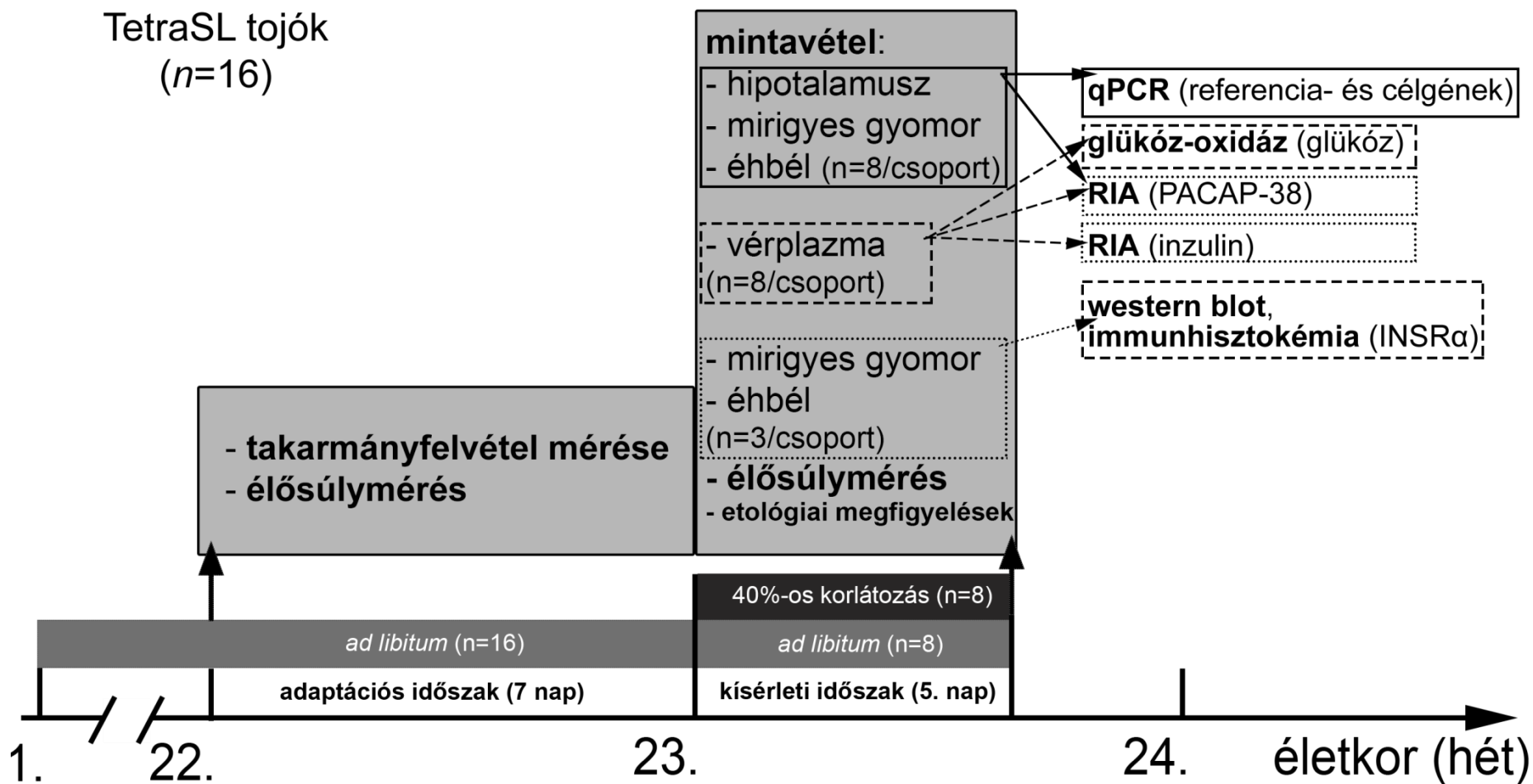


Erőteljes fejlődési képességgel bír, 42 napos korban eléri a 2,77 kg-os élősúlyt, emellett kimagasló takarmányértékesítés jellemzi.

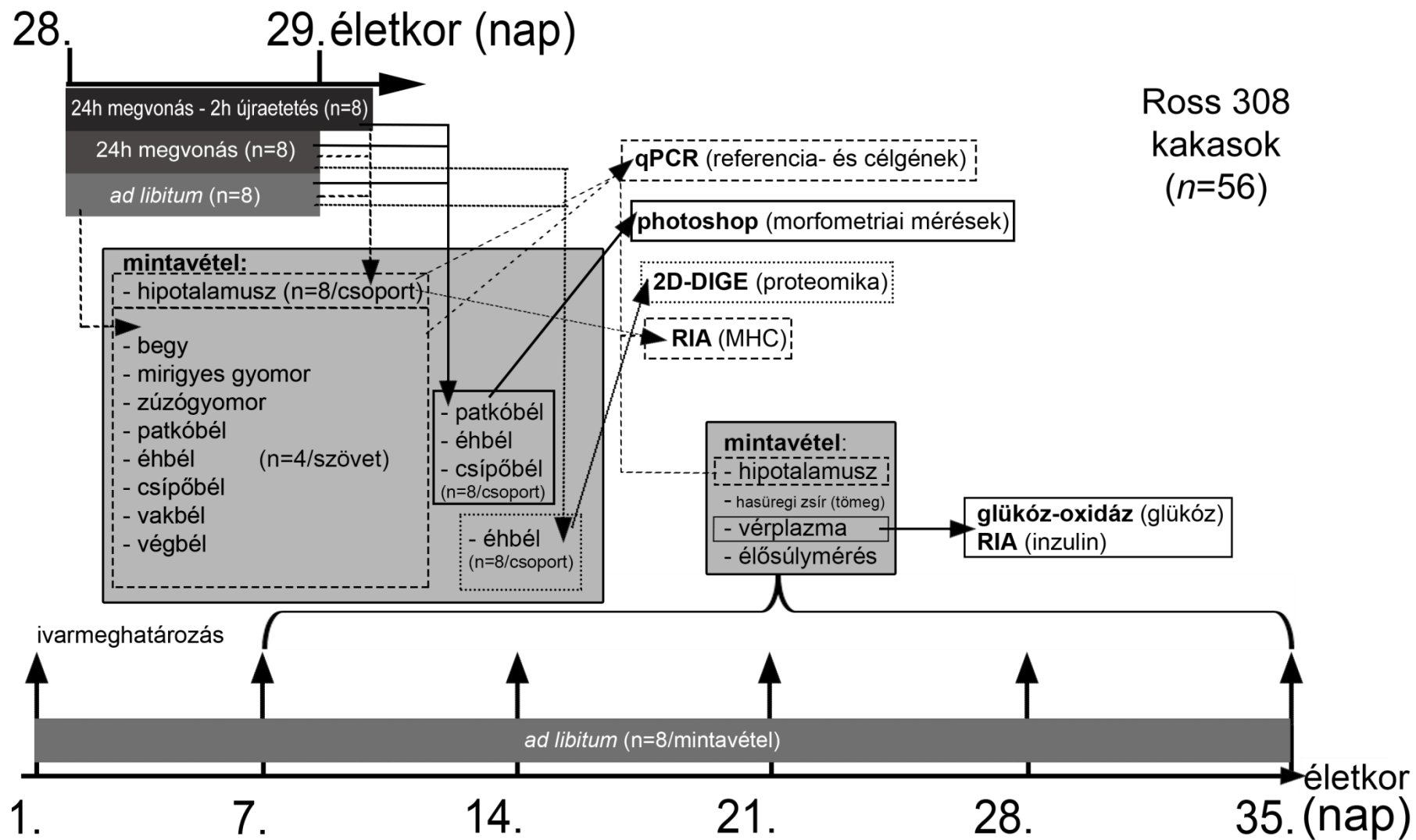
Külleme szerint tollazata fehér színű, mind a tojók mind a kakasok fehér színűek. Szilárd szervezeti felépítés, jó életképesség jellemzi.

Ajánlott a Ross 308 hibridekkel az intenzív nevelési idő alatt végig, jó minőségű takarmányt etetni (internet 6). A Ross 308 húshibridekkel végzett kísérlet beállítását az 6. ábra szemlélteti.

3.2.3 A kísérleti beállítások



5. ábra: A takarmánymegvonás-újraetetés és a növekedés hatásának vizsgálatára beállított kísérlet és a mintavételezés folyamatábrája.



37 6. ábra: A takarmánymegvonás-újraetetés és a növekedés hatásának vizsgálatára beállított kísérlet és a mintavételezés folyamatábrája.

3.3 Általános módszerek

3.3.1 Mintavétel

Az élősúlyt digitális mérleggel megmértem a terminálás előtt. 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 (~ 150 mg) agyatlasz segítségével izoláltam, az izolálás a köztiagy a látóideg kereszteződés és a szemmozgató ideg által határolt területének merőleges bemetszésével történt. (Griffin és mtsai., 2001; internet 7). A dekapitálás során minden egyedből 5 ml vért gyűjtöttem etilén-diamin-tetraecetsavval (EDTA) burkolt vérgyűjtő csövekbe (S-Monovette, Sarstedt, Németország). 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. A mintavételezés egyedenként 15 percig tartott. Ezzel párhuzamosan a hasüreg is feltárása került 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 (3.4 és 3.6 fejezet). Szövetmintát vettem a begyből, mirigyes gyomorból, zúzógyomorból, patkóbélből, éhbélből, csípőbélből, vakbélből és a végbélből is (3.6 fejezet). A szervekből származó mintákat foszfát pufferes sóoldatban (PBS) átmostam (3. melléklet). A hasüregi zsírt is kimetszettem, összegyűjtöttem és a tömegét megmértem (3.6 fejezet). A levett szövetmintákat kriocsövekbe helyeztem, folyékony nitrogénnel hűtöttem, majd -70 °C-on tároltam.

3.3.2 Vérplazma glükóz és inzulin mérések

A kísérletbe vont madaraktól a dekapitáció után 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, majd azonnal folyékony nitrogénnel hűtöttem. Ezt követően -70 °C-on tároltam a későbbi vizsgálatig. A vércukorszint mérések a glükóz-oxidáz módszerrel történt (Accu-Chek Active, Roche Diagnosztika, Magyarország). A vérplazma inzulin mérések immunoradiometriás (IRMA) esszé kittel történtek (RK-400CT, Izotóp Intézet Kft. Budapest, Magyarország) a kit leírása alapján.

3.3.3 RNS-izolálás, cDNS szintézis és qPCR

A szövetmintákat folyékony nitrogénben mozsár segítségével porrá őröltem, majd a mintát TRI reagens oldatban lizáltam rotor-státor homogenizálóval (Ultra-Turrax T10, IKA, Németország) 30 másodpercig, 30000 rpm-el. A totál RNS-t mintánként 30 ± 3 mg, illetve $25 \pm 2,5$ mg homogenizált szövetből vontam ki RNeasy Mini Kit, illetve Direct-zol RNS MiniPrep (Zymo Research, Orange, CA, USA) segítségével, 30 U DNáz I emésztés beiktatásával a gyártó által leírt protokoll alapján (3.4, illetve 3.5 és 3.6 fejezet). Az elúciót 50 μ l 70 °C-os AccuGENE RNáz, DNáz-mentes vízzel végeztem. Az RNS kvantitálását és tisztaságának ellenőrzését NanoDrop ND-1000 spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific) segítségével végeztem. A minták átlagos koncentrációja 101,29 ng/ μ l, illetve 97,68 ng/ μ l, tisztaságát fehérjékre nézve (260/280 nm mért abszorbancia aránya) átlagosan 2,08, míg szerves oldószerekre (260/230 nm mért abszorbancia aránya) 2,09, illetve 2,07 volt (3.4, illetve 3.5 és 3.6 fejezet). Az RNS integritását 1%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztem Aranda és mtsai. (2012) által részletezett módszer alapján, degradációt nem tapasztaltam.

A kvantitált totál RNS-mintákból 2 μ g-ot, illetve 800 ng-ot Maxima First Strand cDNA illetve qPCRBIO cDNS szintézis kit (3.4, illetve 3.5 és 3.6 fejezet) segítségével írtam át 20 μ l reakció térfogatban, a reakciókondíciók megegyeztek a gyártó ajánlásaival, illetve az utóbbi kit esetén a következők voltak: reverz transzkripció 42 °C 30 perc, denaturáció 85 °C 10 perc. Az átírást követően a mintákat tízszeresére hígítottam RNáz, DNáz-mentes vízzel (AccuGENE), majd -20 °C-on tároltam.

A cél- és referenciagén cDNS-ére specifikus primereket (4. melléklet) a Primer Express 3.0.1. verziójával terveztem, a nukleotid szekvenciákat az NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) nukleotid adatbázisából töltöttem le. Ügyeltem arra, hogy az ampliconok mérete ne legyen 150 bp-nál nagyobb. A kisebb méretű termékek hatékonyabban amplifikálódnak, valamint ezáltal a qPCR esszé függetleníthető az esetleges RNS degradációtól (Fleige és Pfaffl, 2006.). Az *ACTB*, *B2M*, *LBR* és *YWHAZ* referenciagének stabilitását a NormFinder szoftverrel végeztem. Stabil referenciagének a hipotalamuszban az *ACTB*-t jelöltem ki, míg a perifériás szervekben az *YWHAZ*-t (3.4 fejezet). A 10 kandidáns referenciagént az irodalmi áttekintésem és Nascimento és mtsai. (2015) és Olias és mtsai. (2014) közleményei alapján válogattam össze (3.5 fejezet). A primerek tapadás hőmérsékletét

PTC-200 grádiens PCR gépben optimalizáltam (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 58-69 °C között.

A qPCR-t triplikátumokban futtattam 96, illetve 384 vályús lemezeken, mind a célgéneket, mind a referenciagéneket egy mérésben. A lemezeket 1500 g-n centrifugáltam 2 percig, mielőtt betöltöttem a qPCR gépbe. A reakciókat egy ABI 7300 real-time PCR gépben (Life Technologies), illetve LightCycler 480 II qPCR gépben (Roche Life Science) futattam. A hőmérsékletprofil az előbbi esetben 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. Az utóbbiban 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 20 µl, illetve 10 µl végtérfogatú reakcióelegyek 50, illetve 4 ng cDNS templátot, 1X molarányú Xceed qPCR SG Hi-ROX mastermixet, illetve Power SYBR Green mastermix-et (Life Technologies) és 200 nM koncentrációban forward és reverz primert tartalmaztak. A minták mellett templátmentes kontrollokat és RTáz-mentes kontrollokat is futattam (*RN18S* esetén, amit egyetlen exon kódol) a DNS kontamináció ellenőrzésére. A primerek specificitását az oladási görbékkel elemeztem, az amplikonok 60-tól 95 °C-ig történő melegítésével (5. melléklet).

A reakciók végeztével a nyers fluoreszcens adatokat az SDS 1.3.1 adatgyűjtő szoftverből (Life Technologies), illetve a LightCycler 1.5.0 adatgyűjtő szoftverből (Roche Life Science) szöveges fájlba exportáltam, majd a LightCycler 480 szöveg fájl konverterrel a LinRegPCR szoftver (mindkettő elérhető: <http://www.hartfaalcentrum.nl>, Ruijter és mtsai., 2009) számára beolvasható formátummá alakítottam. A reakcióhatékonyságokat és a C_q értékeket a LinRegPCR 2015.0, illetve 2016.0 verziójával határoztam meg.

A célgének relatív kvantitálásához a Pfaffl (2001) által leírt képletet használtam:

$$R = \frac{(E_{\text{célgén}})^{\Delta Cq_{\text{célgén}}(\text{kontroll-kísérlet})}}{(E_{\text{ref.gén}})^{\Delta Cq_{\text{ref.gén}}(\text{kontroll-kísérlet})}}$$

Ahol, R: génexpressziós arány; E: reakcióhatékonyság; Cq: kvantitatív ciklus; ref.gén: referenciagén.

3.3.4 Fehérjeizolálás

A hipotalamusz, éhbél és mirigyes gyomor mintákból $75 \pm 7,5$ mg-ot $750 \mu\text{l}$ jéghideg AccuGENE vízben homogenizáltam rotor-státor homogenizálóval (Ultra-Turrax T10, IKA, Németország) 30 másodpercig, 30000 rpm-el. A homogenizált mintákat ezután 20000 g-vel 10 percig, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on centrifugáltam (5810 R, Eppendorf). A felülúszókat $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam a további felhasználásig (3.4.2, illetve 3.6.2 fejezet).

Az éhbél és mirigyes gyomor mintákból 30 ± 3 mg-ot lízis pufferben (150 mM nátrium-klorid, 1% Triton X-100, 50 mM Trisz, pH: 8,0; 1X ProteoBlock proteáz inhibitor koktél 5 mM EDTA-val) homogenizáltam. A lizátumokat jégen 2 órán keresztül inkubáltam, majd 20000 g-n 20 percig centrifugáltam $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on. A felülúszók fehérje koncentrációját RC DC esszé segítségével mértem meg, majd $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam a további felhasználásig (3.4.3 fejezet).

Az éhbélmintákból 100 mg-ot folyékony nitrogénnel dörzsözősárban porrá őröltem. Ezt követően analitikai mérleg segítségével kimértem 50 mg szövetmintát alacsony fehérje affinitású Eppendorf csövekbe (LoBind, Eppendorf), majd minden mintához $500 \mu\text{l}$ jéghideg lízis puffert (7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 30 mM Trisz, pH 8,8) adtam. A mintákat egy órára jégre helyeztem, közben minden 10. percben vortexeltem azokat 10 másodpercig. A lízist követően a homogenizátumokat centrifugáltam 16000 g-n 30 percig $4 \text{ }^\circ\text{C}$ -on (Centrifuge 5810 R, Eppendorf). A felülúszót új csövekbe vittem át, és $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam a további felhasználásig (3.7.3 fejezet).

3.3.5 Statisztikai elemzés

A statisztikai elemzést a GraphPad Prism 6 szoftverrel (La Jolla, California, USA) végeztem. Két csoport átlagának összehasonlítására Student-féle kétoldali, párosítatlan t-tesztet használtam. Három vagy több csoport átlagának vizsgálatakor egytényezős varianciaanalízist (ANOVA) használtam, amit Tukey-Kramer *post hoc* teszt követett (többszörös összehasonlítás). A növekedés a mért paraméterekre gyakorolt hatásának vizsgálatához az ANOVA mellett lineáris és nem-lineáris trendelemzést is végeztem. A korrelációs mátrixok felvételéhez Spearman korrelációelemzést használtam. Minden esetben a $P < 0,05$ értékeket tekintettem szignifikáns különbségnek. Az adatokat átlag \pm átlag közepes hibája (SEM) értékeként jelenítettem meg. Az ábrákon a * szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) jelöl az *ad libitum* csoporthoz képest. A varianciaanalízis esetén, ha a csoportok különböző betűjellel vannak jelölve az szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) jelöl a csoportátlagok között.

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

3.4.1 Állatok és a kísérleti beállítás

A kísérletet Tetra SL tojóhibridekkel állítottam be. Annak érdekében, hogy elkerüljem a takarmánykorlátozás hatására esetleges ivarból adódó eltérő expressziós válaszokat, a kísérletben csak nőivarú egyedeket használtam. 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 átlagos takarmányfelvétel egyedenként naponta 102,6 g volt). 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 takarmányfelvételt minden nap mértem (109,5 g ± 7,03 volt az *ad libitum* és 64,48 ± 5,99 a 40%-os takarmánykorlátozott csoportban). 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 világítási program 16 óra fény, 8 óra sötét volt. A célgének expresszióját a 3.3.3. fejezetben részletezett módon végeztem, a vérplazma glükóz és inzulin mérések a 3.3.2 fejezetben leírtak szerint zajlottak.

3.4.2 PACAP-38 radioimmunesszé

A PACAP-38 peptid kivonása dupla térfogatú abszolút alkohol és 20 µl 96%-os ecetsav hozzáadásával történt. 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 Jakob és mtsai. (2004) által részletezett lépések alapján történtek.

3.4.3 Western blot

A fehérjeizolálást (3.3.4 fejezet) követően 40 µg fehérjét 1X Laemmli pufferben (2% nátrium-dodecil-szulfát [SDS], 5% β-merkaptotanol, 10% glicerin, 6,25 mM Trisz, brómfenol kék, pH: 6,8) forraltam 70 °C-on 5 percig. Ezt követően a fehérjemintákat 8%-os SDS-PAGE minigéleken választottam el 25 mM Trisz, 192 mM glicin pufferben 90V feszültségen, amíg a minták elérték a gyűjtőgél alját, majd 180V-on amíg a brómfenol kék jelzőfesték elérte a gélek végét. Az elválasztott fehérjéket 0,45 µm pórusátmérőjű polivinilidén-difluorid (PVDF) membránra (Immobilon-P, Millipore) blottoltam Omni Page mini tank blottolóval (Cleaver Scientific) 25 mM Trisz, 192 mM glicin és 10% metanolt tartalmazó pufferben. Az alkalmazott áramerősség 2,5 mA/cm² volt 90 percig. A transzfert követően a membránokat az előfestett molekulamarker figyelembe vételével kettévágtam. Ezt követte a blokkolás 1% borjú szérum albumint (BSA) tartalmazó TBST pufferrel (20 mM Trisz, 150 mM nátrium-klorid, 0,1% Tween-20) 1 órán át 22 °C-on. Ezután 16 órán át inkubáltam a blokkolt membránokat 4 °C-on nyúlban termeltetett, INSRα-specifikus elsődleges poliklonális ellenanyaggal (bs-0047R, Bioss Inc., USA), illetve β-aktinra specifikus (4967S, Cell Signaling Technology, USA) ellenanyaggal, amit blokkoló pufferben hígítottam (1:5000, illetve 1:10000 arányban). A jelölést követte a membránok mosása TBST pufferben négy alkalommal, 5 percig. Ezt követte az inkubáció a tormaperoxidázal konjugált, kecskében termelt, nyúl elleni másodlagos ellenanyaggal (ab97051, Abcam Ltd., USA) 1 órán át 1:10000 arányban blokkoló pufferben hígítva, szobahőn. Ezután a membránokat négyszer mostam 5 percen át. Ezt követte a membránok 5 percen át történő inkubálása SuperSignal West Femto fokozott kemilumineszcencia (ECL) reagenssel. A blottok digitalizálását MultiImage III cabinet-ben végeztem az Alpha View FluorChemQ v.3.4.0 szoftverrel (Alpha Innotech, ProteinSimple, USA) 5 perces, illetve 10 perces expozíciós időt használva. A képeket 16 bites .tif fájlba mentettem, majd a denzitometrált az ImageJ 1.50f szoftverrel (NIH, USA) végeztem. Normalizáláshoz a β-aktin fehérje denzitásait használtam.

3.4.4 Immunhisztokémia

A szöveti morfológia megőrzése érdekében a mirigyes gyomor és az éhbélmintákat $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -os fixáló oldatba (Sainte-Marie, 1962) helyeztem 16 órára, majd $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra helyeztem át 24 órára, majd 24 órán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tartottam. A szövetminták dehidrációja etanolban történt, majd ezt követte a paraffinba ágyazás és $5\text{ }\mu\text{m}$ vastag szeletekre metszés mikrotóm segítségével (Microm HM335-E, Németország). A metszetek deparaffinálása xilénnel történt, majd ezt követte a csökkenő koncentrációjú etanol oldatos rehidrálás, majd a tárolás PBS oldatban. A nem-specifikus antitest-antigén kötések blokkolása 2%-os BSA oldatban történt 30 percig, szobahőn. A metszetek inkubálása először INSR α -specifikus antitesttel (1:200 antitest-PBS arány, Bioss Inc., USA) történt 16 órán át $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on. Ezt követte a PBS-es mosás és a metszeteket biotinált anti-egér immunglobulin G-vel (IgG, 1:200, Vector, USA) történő inkubálása 1 órán át szobahőn, illetve Alexa488 konjugált, anti-egér IgG-vel (1:500, Invitrogen, USA) 2 órán át szobahőn. A metszetek festése 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidrokloriddal (DAPI) történt, ezt követte az elhalványulás gátló mowiol-al történő fedés.

A másodlagos antitest jelölés után a metszetek PBS-el történő mosása következett, majd ezt követte az inkubáció a peroxidáz konjugált, avidin-biotin komplexszel (1:200, Vector, USA), 1 órán át szobahőn. A mosást a diamino-benzidines (DAB, Vector, USA) festés követte a gyártó ajánlásai szerint. A metszetek öblítését és dehidrálását a Depex közegbe történő beágyazás követte (Sigma-Aldrich, USA).

3.4.5 Etológiai megfigyelések

A 8-8 kísérleti egyed, négy megfigyelő egy órán át figyelte 8:00 és 9:00 óra között a kísérlet 3., 4. és 5. napján. A takarmány- és vízfelvételhez köthető (evés, ivás, kaparás, padlózat csipkedése, takarmánykeresés kinyújtott nyakkal), fizikai aktivitásokhoz köthetőket (pihenés, járás) vagy a komfort és stresszhez köthető (faroktollazat csipkedése, rácsozat csipkedése, szárnynyújtogatás és tollázkodás) viselkedésmintázatok rögzítésre kerültek. A viselkedésminták időtartama nem, csak a gyakoriságuk került rögzítésre.

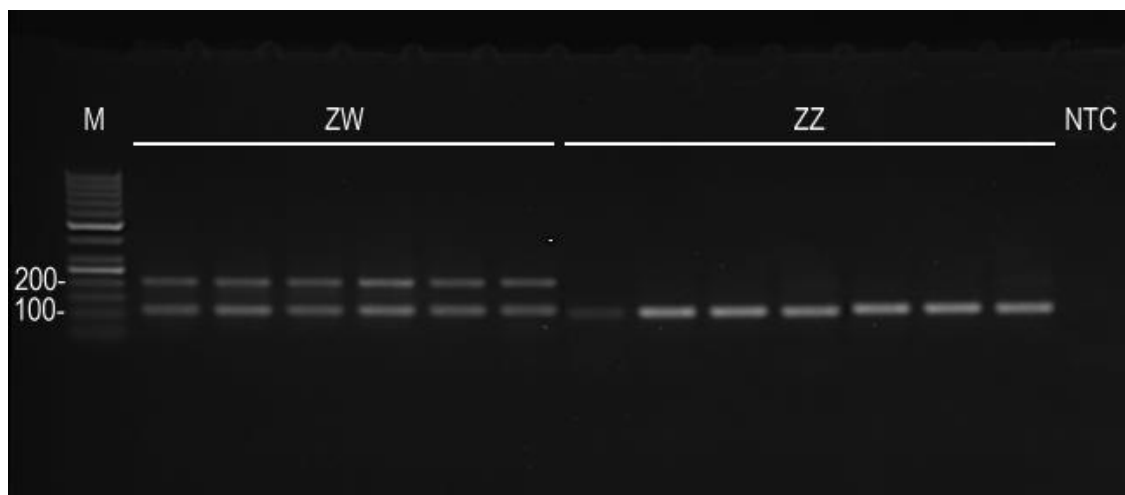
3.5 Stabilan kifejeződő referenciagének kiválasztása a brojlercsirke hipotalamuszában, különböző táplálóanyag-ellátottság mellett

3.5.1 Az irodalmi áttekintés anyag és módszere

Az irodalmi áttekintést a Web of Science v5.22 bibliográfiai keresőprogrammal végeztem (<https://webofknowledge.com/>). Keresőszavakként a “chick* AND gene AND expression NOT fasting” 2015 és 2016 között ($n=100$ találatot dolgoztam fel), valamint a “chick* AND gene AND expression AND fasting” 2010 és 2016 (összesen $n=42$ találat). Csak azokat a találatokat dolgoztam fel, amik qPCR módszert használtak a génextpressziós vizsgálatokhoz (az *in situ* hibridizációt és a northern blot módszert kizártam). Valamint a stabil referenciagéneket kereső publikációkat is kizártam.

3.5.2 Állatok és a kísérleti beállítás

A derecskei baromfikeltezőből származó egy napos brojlercsirkéket (Ross 308 hibrid) 28 napos korukig neveltem. Az egyedek szexálását (7. ábra) az ivari kromoszómák PCR esszéjével végeztem. A szárnytollak DNS kivonását Malagó és mtsai. (2002) által közölt protokoll alapján végeztem, az ivari kromoszómákra specifikus primereket Li és mtsai. (2012) közleményéből adaptáltam (4. melléklet). Alomként faforgácsot használtam, az itatók Plasson típusúak voltak. A hőmérséklet 32 °C volt az állatok érkezésekor, majd fokozatosan csökkentettem (1,5 °C/hét). A fényprogram egyezett a Ross 308 tartástechnológiai ajánlásával (17 óra fény, 7 óra sötét). 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 takarmánymegvonást követő 2 órás *ad libitum* újraetetés (F24hRF2h csoport). A kísérlet alatt a madarakat brojler nevelő táppal takarmányoztam (20% nyers fehérje, 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 célgének expresszióját a 3.3.3. fejezetben részletezett módon végeztem, a vérplazma glükóz és inzulin mérések a 3.3.2 fejezetben leírtak szerint zajlottak.



7. ábra: A kísérletbe vont néhány egyed nemének azonosítása PCR segítségével. Az ivari kromoszóma-specifikus reverz primerek Z kromoszóma esetén 107 bázispár (bp) méretű terméket amplifikálnak, míg W kromoszóma esetén 202 bp méretű terméket kapunk. ZW: nőivarú egyedek, ZZ: hímivarú egyedek. M: Generuler 50 bp DNS létra. NTC: templatmentes kontroll. 1,5%-os agaróz gél, 0,5 µg/ml etídium-bromiddal festve.

3.5.3 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. Jelenleg nincs tudományos egyetértés abban, hogy melyik módszer adja a legmegbízhatóbb eredményt. Ezért az egyes módszerekből származó stabilitási értékek alapján rangsoroltam a referenciagéneket, majd a rangsorok geometriai átlagolásával felállítottam a végső rangsort.

BestKeeper

A BestKeeper nyers (normalizálatlan) C_q értékek elemzését végzi. A módszer leíró statisztikát használ a stabilitásvizsgálathoz, szórás (SD) és variációs együttható (CV) értékeket számol. A módszer szerzőinek ajánlása, hogy a stabilitásvizsgálat kezdődjön az SD és CV értékelésével (Pfaffl és mtsai., 2004). A legstabilabb gén mutatja a legkisebb szórást, az ajánlás szerint 1 SD alatt az adott gén stabilan expresszálódik. További stabilitási mutató a BestKeeper index, ami a referenciagének

Cq értékeinek geometriai átlaga korreláltatva az egyes gének Cq értékével. A szerzők nem tisztázzák, hogy melyik mutató (SD, CV vagy az r értékek) a legfontosabb. Így a referenciagéneket mindhárom érték szerint rangsoroltam, majd a rangsorok geometriai átlagát kiszámoltam és ezek újrarangsorolásával állapítottam meg a végső rangsort.

geNorm

A geNorm módszert Vandesompele és mtsai. (2002) közölte. A módszer relatív skálára emelt értékekkel számol. Ehhez a Cq értékeket az alábbi egyenlettel alakítottam át: $2^{\Delta Cq=(\min Cq-Cq)}$, ahol a minCq az adott referenciagén legkisebb Cq értékét jelöli. Az így kapott relatív skála 0 és 1 között terjed, ami a szoftver további számolásainak alapját képezi. A szoftver először kiszámolja páronként a referenciagének expressziós arányát minden lehetséges kombinációban. Ezt követően kiszámolja a szórását ezeknek a kombinációknak. Majd ezt követi az M érték megállapítása mindegyik referenciagénhez. Ez a páronként kiszámolt szórások átlagolásával jön létre. Minél kisebb ez az érték, annál stabilabban fejeződik ki az adott gén. A szerzők megállapítása, hogy 0,5 érték alatt stabilnak tekinthető az adott gén expressziója.

NormFinder

A módszert Andersen és mtsai. (2004) közölték. Varianciaanalízis modell alapú módszer, ami nem csak az adott gén expressziós stabilitását állapítja meg, hanem az egyes kísérleti csoportokon belül is meghatározza azt. A csoportokon belüli és a csoportok közti varianciát stabilitási értéké (Sv) egyesíti. Ez alapján lehet rangsorolni az egyes referenciagéneket megfelelőségük tekintetében, minél kisebb ez az érték annál stabilabb az adott gén expressziója. A geNormhoz hasonlóan ez a módszer is relatív adathalmazt igényel.

Az összehasonlító ΔC_t módszer

Ezt a módszert Silver és mtsai. (2006) közzétették először. A módszer nyers C_q értékeket igényel. Kezdeként az első referenciagén-jelölt C_q értékét és kivontam a vizsgálatba vont soron következő referenciagén C_q értékéből, amit ugyanabban a mintában mértem, vagyis kiszámoltam a delta C_q (ΔC_q) értékeket minden mintában (innen a módszer neve). Majd ugyanilyen módon folytattam a következő referenciagén párral, amíg megkaptam a ΔC_q értékeket minden lehetséges kombinációban. Ezt követően kiszámoltam a ΔC_q értékek szórását a minták között, majd végül ezek átlagát kiszámoltam. A legkisebb átlagos szórással bíró referenciagén a legstabilabb, míg a legnagyobb a leginstabilabb kifejeződésű.

A Chervoneva és mtsai. (2010) által közölt módszer

Ez az eljárás szintén nyers C_q értékeket használ a számoláshoz. A módszer kovariancia mátrixot hoz létre többváltozós varianciaelemzéssel. A módszer újramintavételezéssel (bootstrapping) növeli az eredmények megbízhatóságát. A kisebb stabilitási értékkel rendelkező referenciagén stabilabb kifejeződést feltételez.

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

3.6.1 Állatok és a kísérleti beállítás

Az állatok tartási körülményei megegyeztek a 3.5.2 fejezetben leírtakkal, illetve a kísérleti beállítás ugyanaz volt a takarmánymegvonás-újraetett csoportokat tekintve. A növekedési kísérlet alatt 8 egyedet vágtam le a 7., 14., 21., 28. (3.5.2 fejezetben részletezett *ad libitum* csoportjával azonos egyedek) és a 35. napon. A célgének expresszióját a 3.3.3. fejezetben részletezett módon végeztem, a vérplazma glükóz és inzulin mérések a 3.3.2 fejezetben leírtak szerint zajlottak. A *PMCH* és az *MCHR4* génekre primeket terveztem (4. melléklet) és megmértem hipotalamikus kifejeződésüket. Az 4.2 fejezetben megállapított legstabilabb referenciagén (*TBP*) Cq értékeit használtam a normalizáláshoz, míg a növekedési eredmények megbízható normalizálása érdekében ismét elvégeztem a referenciagén keresést, aminek eredményét a 16. táblázatban részletezem.

3.6.2 MCH radioimmunesszé

A fehérjeizolálást követően (3.3.4 fejezet) a hipotalamusz MCH koncentrációk mérése Lelesz és mtsai. (2016) által leírtak szerint zajlott.

3.7 A takarmánymegvonás hatása a házityúk középbelének morfometriájára és az éhbelének proteomjára

3.7.1 Állatok és a kísérleti beállítás

Az állatok tartási körülményei megegyeztek a 3.5.2 fejezetben leírtakkal, illetve a kísérleti beállítás ugyanaz volt a takarmánymegvonás-újraetett csoportokat tekintve. A mintavétel a 3.3.1 fejezetben részletezett módon történt.

3.7.2 Középbél morfometriai mérések

A vizsgált szöveteket kilenc, 28 napos 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 (3.4.4 fejezet). Az immunjelölés helyett a metszetek hematoxilin-eozin festésére került sor Fischer és mtsai. (2008) szerint, majd a lemezek Leitz Diaplan mikroszkóp Peltier-elem hűtésű kamerájával (Spot RT-Slider, Diagnostic Instruments, USA) lettek digitalizálva. A morfometriai méréseket az Adobe Photoshop CC szoftver 20150529.r.r88x32 verziójával végeztem (Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA). A vonalzó eszközzel először megmértem az 1 mm-es skála pixelben mért kiterjedését (ami 510 pixel volt), ezt követően a mérés skála fülön 1 mm logikai hosszak 510 pixelt állítottam be. Ezek után a vonalzó eszközzel megmértem a kripták mélységét és a *muscularis externa* vastagságát, illetve a gyorskijelölő eszközzel a villusok területét. Az így felvett méréseket szöveges fájlba exportáltam.

3.7.3 A fehérjék jelölése fluoreszcens festékekkel

A fehérjekoncentrációt az RC DC Protein esszé készlettel mértem, két mosási lépéssel az esszé detergens kompatibilitásának növelése érdekében. A négytagú sztenderdsort egy 15 mg/ml koncentrációjú BSA oldat kétszeres, soros hígításával kaptam. Az abszorbancia adatokat SPECTROstar Nano (BMG Labtech) mikrolemez olvasóval mértem 650 nm-en, majd a mintakoncentrációkat a sztenderdek abszorbanciája alapján számoltam ki a MARS 3.10 adatelemző szoftverrel (BMG Labtech). A lizátum fehérjekoncentrációi a jelöléshez megfelelő, 5,32-11,11 µg/µl tartományban voltak. A fluoreszcens jelölés előtt a minták jelöléshez megfelelő pH-ját (8-9) univerzális pH papírral ellenőriztem (Rota, VWR). Két csoport minden mintájából létrehoztam egy referenciaminta-keveréket. 50 µg mintakeveréket 400 pmol cianin-2 (Cy2) aminoészter minimál festéssel jelöltem (Lumiprobe). Minden géltre 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. Megfigyelt jelenség, hogy bizonyos fehérjék az említett festékeket eltérő affinitással kötik, ennek kiküszöbölése érdekében festékcseré módszert (4. táblázat) használtam. A jelölés reakciókat jégen végeztem 30 percig, sötétben, majd 10 mM-os lizin oldattal leállítottam a reakciót 10 percig jégen, sötétben.

4. táblázat: A festékcserés jelölés

gél	fluorofór		
	Cy2	Cy3	Cy5
1	ref.	A-1	F-8
2	ref.	F-7	A-2
3	ref.	A-3	F-6
4	ref.	F-5	A-4
5	ref.	A-5	F-4
6	ref.	F-3	A-6
7	ref.	A-7	F-2
8	ref.	F-1	A-8

ref.: referenciaminta, mintakeverék minden egyedből ($n=16$), A: *ad libitum* csoport ($n=8$), F: 24 órás takarmánymegvont csoport ($n=8$). A számok a különböző egyedeket jelölik.

3.7.4 Kétdimenziós differenciáló gélelektroforézis (2D-DIGE), képelemzés

Az izoelektromos elválasztáshoz 7 cm-es immobilizált lineáris pH gradiens (IPG) szalagokat használtam (pH 5-8, Bio-Rad). Az előkísérleteim elvégzése után megállapítottam, hogy az éhbélminták esetén a fehérjék legnagyobb része ebben a pH tartományban található. A pH szalagokat passzív rehidrációs módszerrel rehidráltam. 150 µg fehérjét, ami 50 µg referencia mintát (olyan belső sztenderdként használható mintakeverék, ami minden egyed fehérjemintáját tartalmazza), 50 µg kontroll és 50 µg kísérleti mintát 125 µl rehidráló pufferben (2 M tiourea, 8 M urea, 2% CHAPS, 0,2% (v/v) Bio-Lyte 4/6 és 6/8 amfolit oldat 1:2 arányban, 0,002% (w/v) brómfenol kék) vettem fel, majd a pH csíkkal 16 órán át szobahőn rehidráltam. Az izoelektromos fókuszálást Protean IEF Cell (Bio-Rad) gépben végeztem, többlépéses elválasztást alkalmazva. Ennek során a mintákat alacsony feszültségen (250 V) fókuszáltam 20 percig, majd a feszültséget fokozatosan növeltem 4000 V-ig, 2,5 órán keresztül, majd ezen a feszültségen tartottam, amíg a futtatás elérte a 15349 voltórát. A 8 csík fókuszálását egyszerre végeztem, az áramerősséget csíkonként 50 mA-re korlátoztam, a fókuszálás hőmérséklete 20 °C volt. A fókuszált immobilizált pH gradiens szalagokat 10 percig 50 rpm-en inkubáltam orbitális rázógéppel (Biosan) 6 M urea, 20% (v/v) glicerin, 2% (w/v) SDS, 50 mM Trisz pH 8,8 és 2% (w/v) DTT tartalmú ekvilibráló oldatban, majd ezt követően további 10 percig 6 M urea, 20% (v/v) glicerin, 2% (w/v) SDS, 50 mM Trisz pH 8,8 és 2,5% (w/v) jódcetamid tartalmú oldatban. Az ekvilibrációt követően a fehérjéket molekulatömegük szerint (második dimenzió) egy OmniPAGE Mini (Cleaver Scientific) vertikális elektroforézis rendszerrel választottam el. Az elektroforézist 100 x 100 x 1 mm kiterjedésű, 13%-os poliakrilamid (37,5:1 akrilamid:bisz-akrilamid arányú) gélekkel végeztem, 25 mM Trisz, 192 mM glicin, 0,1% SDS futtatópufferben. Az elválasztást 90 V feszültséggel kezdtem, amíg a minták átléptek a gyűjtőgélből (0,5% agaróz, 25 mM Trisz, 192 mM glicin, 0,1% SDS) az elválasztó gélbe, majd 180 V-on folytattam, míg a brómfenolkék jelzőfesték el nem érte a gél alját. A foltkivágáshoz a preparatív poliakrilamid géleket (500 µg a fehérjemintakeverékből) kolloid Coomassie G-250 (Thermo Scientific) festéssel tettem láthatóvá Dyballa és Metzger (2009) által leírt protokoll alapján. A DIGE géleket PharosFX Plus (Bio-Rad) lézer szkennelével digitalizáltam, 100 µm felbontású (254 DPI) képek formájában a Quantity One 29.0 (Bio-Rad) adatgyűjtő szoftver segítségével. Ezt követően a nyers képeket 16-bites .tif formátumú fájlkként mentettem ki. A képeket a

Delta2D 4.3 szoftverrel (Decodon, GmbH) elemeztem, ehhez először betöltöttem az egyes gélek különböző csatornákon (Cy2-Cy3-Cy5) szkennelt képeit. A foltok normalizálásához és kvantitálásához a belső sztenderdet (Cy2 csatornán szkennelt képek) használtam fel. A szoftver először az egyazon gélben futtatott minták gélképeit illeszti a velük együtt futtatott belső sztenderd képéhez, majd ezt követi a gélek közti illesztés (In-Gel Standard Warping Strategy). Ezáltal a gélek közti futtatásokból adódó esetleges különbségek kiküszöbölhetőek, vagyis az azonos fehérje folt azonos pozícióba kerül az összes gélen. A következő lépésben a szoftver egy fúziós gélképet hoz létre, melyen a kísérlet összes fehérje foltja megtalálható, ezáltal foltszámlálás és a különálló foltok azonosítása végezhető. Esetünkben ez alatt a két kísérleti csoport 8 biológiai ismétlésének (mivel a fluroesczens jelölés lehetővé teszi két minta és egy sztenderd futtatását egy gélben ez 8 különálló gél jelent) 3 csatornán szkennelt képét értjük, ami összesen 24 beolvasást jelent. Ezt követően a detektált különálló foltokat a szoftver transzferálja az egyes gélképekre és elvégzi azok denzitometrállását: megállapítja (denzitometrája) és összegzi (volume, V) a foltokat felépítő pixelek szürkeárnyalatos skálán mért, háttér nélküli denzitását (esetünkben 16 bites gélképekről van szó, ez a skála 0-65535 között terjedhet pixelenként). Az adott fehérjefolt százalékos intenzitását (V%) a referenciagél-kép azonos foltjához (amit mindig 100%-nak vesz) viszonyítva számolta ki a szoftver.

3.7.5 A fehérjék azonosítása

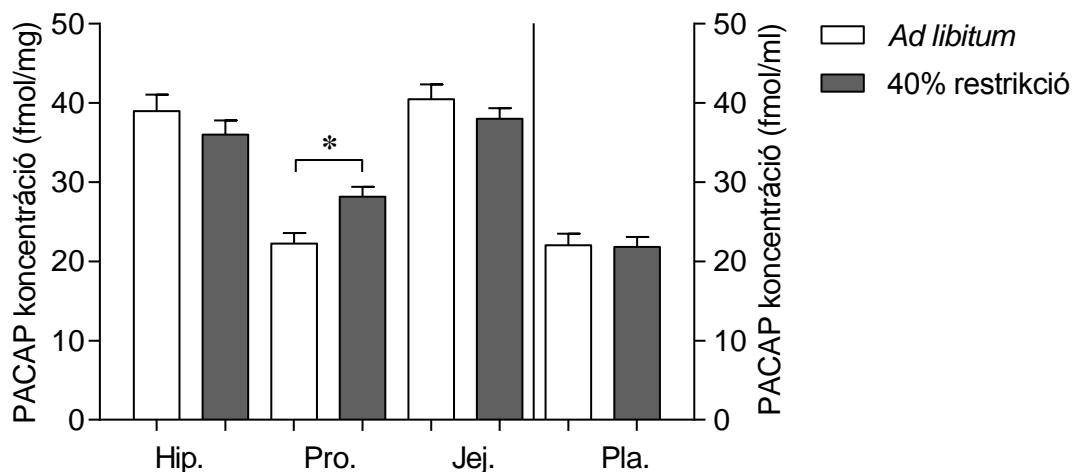
A Delta2D szoftver által kvantitált, megjelölt és a statisztikai próba alapján szignifikáns expressziós különbséget mutató foltokat steril fülke alatt csonkolt 200 µl-es pipettahegyek segítségével kivágtam a Coomassie festett preparatív gélből. A fehérjék emésztése Shevchenko és mtsai. (2006) által leírt 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 deszorpciós, ionizációs (MALDI) tömegspekrométerrel (Ultraflex, Bruker-Daltonics) zajlott. A spektrumok felvétele pozitív ionizációs módban, 50 Hz-es lézer frekvenciával és 100-1000 egyedi spektrum átlagolásával történt. A tömegspektrumok kiértékelése a FlexAnalysis (Bruker-Daltonics) szoftverben zajlott. A peptidszekvenciák alapján a fehérjék végső azonosítását az NCBI-n és a SwissProt adatbázisban a Mascot keresőszoftverrel (Matrix Science) történt.

4. EREDMÉNYEK

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

Megmértem a kiválasztott célgének 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 (*ADCYAPI*) 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 36%-os csökkenést mértem a *GLUT3* és 49%-ot a *GLUT9* estén, valamint 36%-os növekedést az *INSR*, 63%-ot az *NMURI* és 49%-ot a *PAC1* gén kifejeződésében (6. táblázat). A mirigyes gyomor esetén egyedül az *ADCYAPI* mutatott 88%-al nagyobb expressziós különbséget. Az éhbélminták esetén a *GAL*, *NMU*, *NMURI* több mint háromszoros, az *INSR* majdnem kétszeres és az *ADCYAPI* majdnem háromszoros expressziós különbséget mutatott a 40%-os takarmánykorlátozott csoportban, az *ad libitum* 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 (8. 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 a patkányoknál 4-szer nagyobb (Helyes és mtsai., 2007), de a humán plazmakoncentrációnál 15-ször kisebb (Börzsei és mtsai., 2009) és 13-szor kisebb, mint a kecske, bárány vagy szarvasmarha plazmakoncentrációk (Czeglédi és mtsai., 2011). A PACAP-38 hasonló koncentrációban van jelen a brojlercsirke hipotalamuszában is (Józsa és mtsai., 2005).



8. ábra: A PACAP-38 radioimmunszénel mért koncentrációja a különböző szövetekben és a vérplazmában. Hip.: hipotalamusz; Pro.: mirigyes gyomor; Jej.: éhbél; Pla.: plazma. Az átlag ± SEM értékeket jelenítettem meg.

A tojótyúk viselkedését megfigyeltem, az általános és stresszhez köthető viselkedési mintákat rögzítettem (7. táblázat). Egyedül a vízfelvételben mutatkozott különbség ($P < 0,05$) és a szignifikánshoz közeli ($P = 0,060$) különbség volt megfigyelhető padlózat csipkedése esetén, amik a kevesebb takarmánymennyiség hatásának tudhatóak be. A stresszhez és diszkomforthoz köthető viselkedésminták között nem találtam különbséget.

A western blot módszerrel kvantitáltam az INSR α relatív fehérjekoncentrációit a mirigyes gyomor és éhbélmintákban. Egyetlen 135 kDa méretű fehérje sávot detektáltam az ECL-es előhívás után (9. ábra). A denzitometráls alapján nem találtam különbséget a mirigyes gyomormintákban, míg 1,96-szeres expressziós különbséget detektáltam az éhbélmintákban az *ad libitum* csoporthoz képest. A 40%-os takarmánykorlátozás nem befolyásolta a glükóz vérplazma és inzulin szintjét (5. táblázat).

5. táblázat: A vérplazma inzulin- és glükózkoncentrációi a két kísérleti csoportban. Az átlag ± SEM értékeket jelenítettem meg

	<i>ad libitum</i>	40% restrikió	<i>P</i>
glükóz (mmol/l)	14,51±0,29	14,63±0,31	0,796
inzulin (μIU/ml)	18,59±1,62	16,23±2,10	0,384

Az éhbél és mirigyes gyomor metszetek hematoxilin-eozin festést követő mikroszkópos vizsgálata nem mutatott különbséget az epitélium méretében és alakjában. Az INSR α immunfestése alapján azt találtam, hogy az erősebb kifejeződést mutat a lumen felé, a mélyebb, epitel sejtekben pedig nem találtam immunpozitív jelet. Mindkét szövettípus esetén az epitel sejtek apikális részén erősebb jelet láttam (10. és 11. ábra). Gyenge jelet rögzítettem a mirigyes gyomor kötőszöveti rétegében, míg az éhbélben nem találtam immunpozitív jelet ezen a területen, és a takarmánykorlátozás sem változtatott ezen (10. és 11. ábra). Gyenge jelet rögzítettem az *ad libitum* csoport esetén a mirigyes gyomor szubmukóza mirigyeinek epitéliumában és a jel erősebb lett a 40%-os takarmánykorlátozást követően (10. ábra). Ez főleg a sejtmagi INSR α jel fokozódásának köszönhető. Az éhbél esetén a kripták nagy része jelölődött (11. ábra). A jel általában közepes erősségű volt, néhány sejt kevésbé, míg mások intenzívebben jelölődtek. Általában nagyobb jelintenzitás volt mérhető a takarmánykorlátozott csoportban a sejtmagból származó erősebb jel miatt (12. ábra). Az izomrétegekben az INSR α gyenge vagy hiányzó jelét tapasztaltam (8. táblázat). Az *INSR* gén expressziója megnőtt az éhbélben takarmánykorlátozás hatására, mind mRNS és fehérje szinten. Az immunhisztokémiai jelöléssel megállapítottam, hogy a fokozott expresszió a kripták és a villusok epitéliumában mutatható ki.

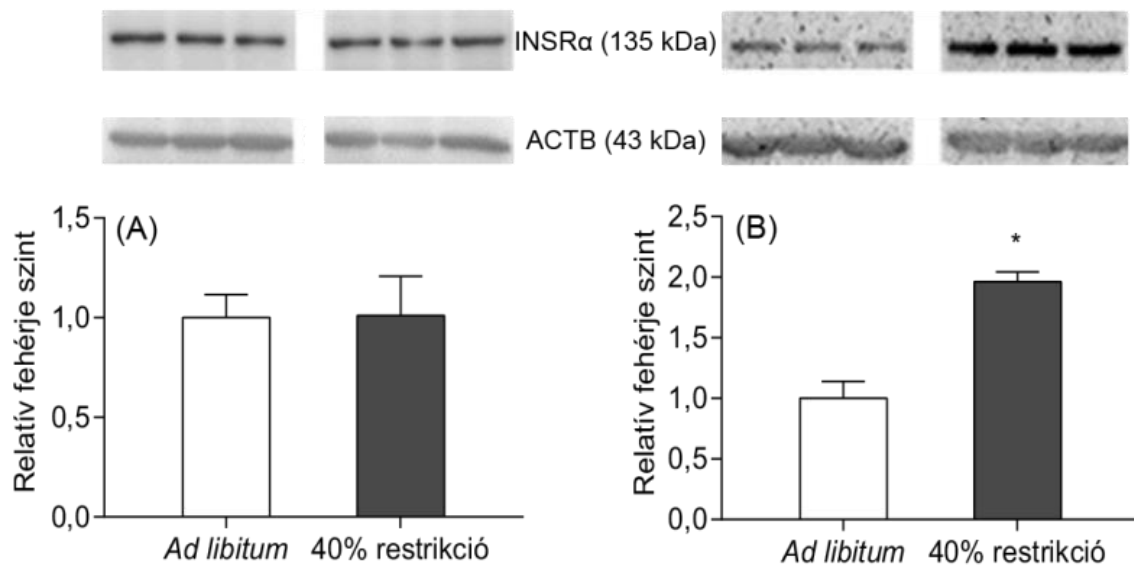
6. táblázat: A 40%-os takarmánykorlátozás hatása a választott célgének kifejeződésére. Az átlag \pm SEM értékeket jelenítettem meg

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*\pm0,09	1 \pm 0,03	2,76*\pm0,08
<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*\pm0,02
<i>GLUT1</i>	1 \pm 0,11	1,10 \pm 0,06	1 \pm 0,31	1,09 \pm 0,19	1 \pm 0,11	1,23 \pm 0,30
<i>GLUT2</i>	1 \pm 0,31	0,78 \pm 0,19	1 \pm 0,27	1,29 \pm 0,25	1 \pm 0,33	0,68 \pm 0,19
<i>GLUT3</i>	1 \pm 0,47	0,36*\pm0,08	1 \pm 0,24	0,76 \pm 0,15	1 \pm 0,16	1,38 \pm 0,31
<i>GLUT8</i>	1 \pm 0,08	0,63 \pm 0,06	1 \pm 0,27	0,70 \pm 0,19	1 \pm 0,24	0,99 \pm 0,44
<i>GLUT9</i>	1 \pm 0,39	0,49*\pm0,12	1 \pm 0,32	0,58 \pm 0,22	1 \pm 0,17	1,05 \pm 0,28
<i>INSR</i>	1 \pm 0,09	1,36*\pm0,08	1 \pm 0,16	1,01 \pm 0,2	1 \pm 0,01	1,96*\pm0,08
<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*\pm0,19
<i>NMUR1</i>	1 \pm 0,02	1,63*\pm0,04	1 \pm 0,07	0,90 \pm 0,20	1 \pm 0,05	3,01*\pm0,09
<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*\pm0,03	1 \pm 0,03	1,07 \pm 0,12	1 \pm 0,13	1,01 \pm 0,02

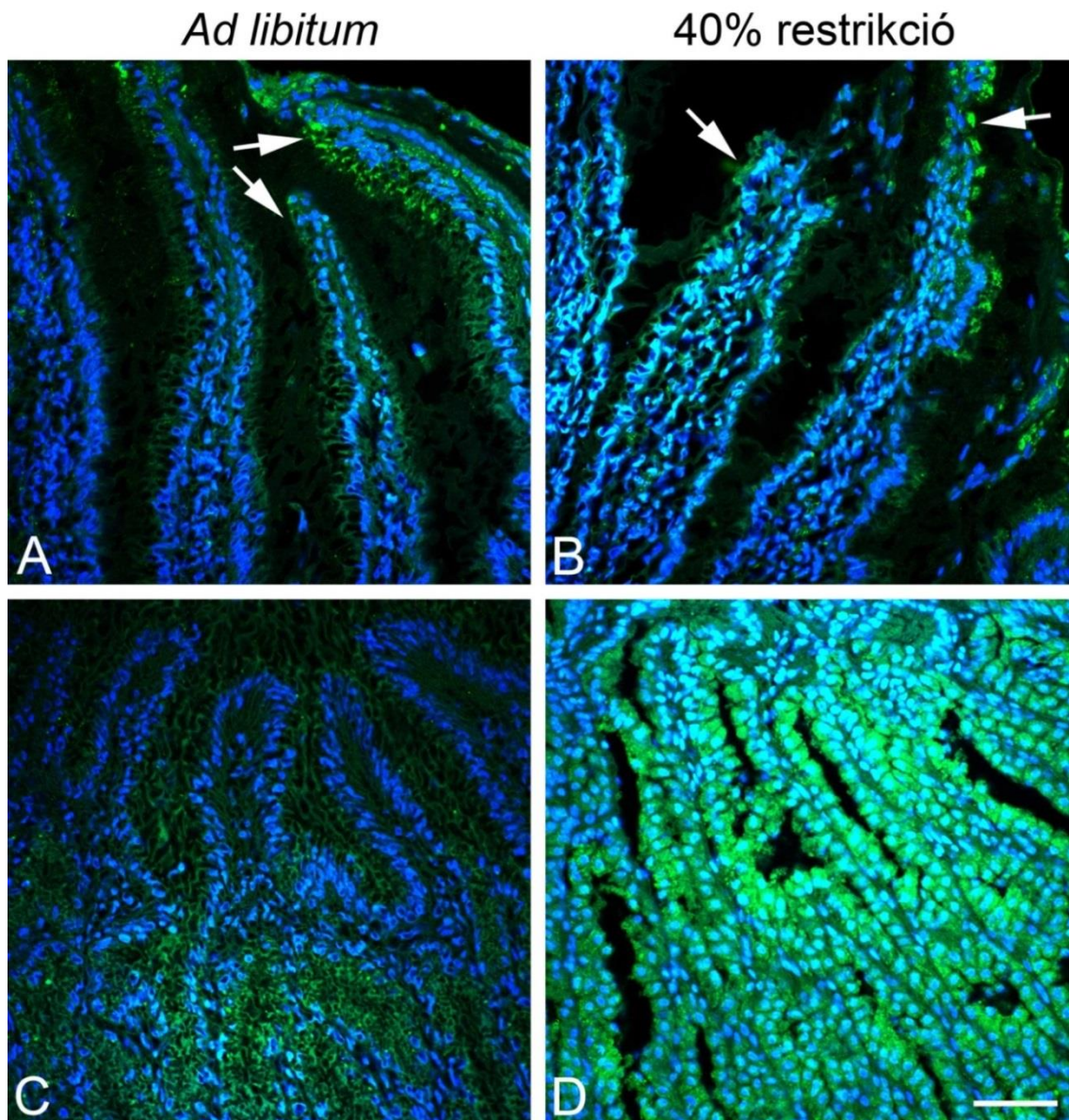
7. táblázat: A 40%-os takarmánykorlátozás hatása a különböző viselkedés mintákra.

Az átlag \pm SEM értékeket jelenítettem meg

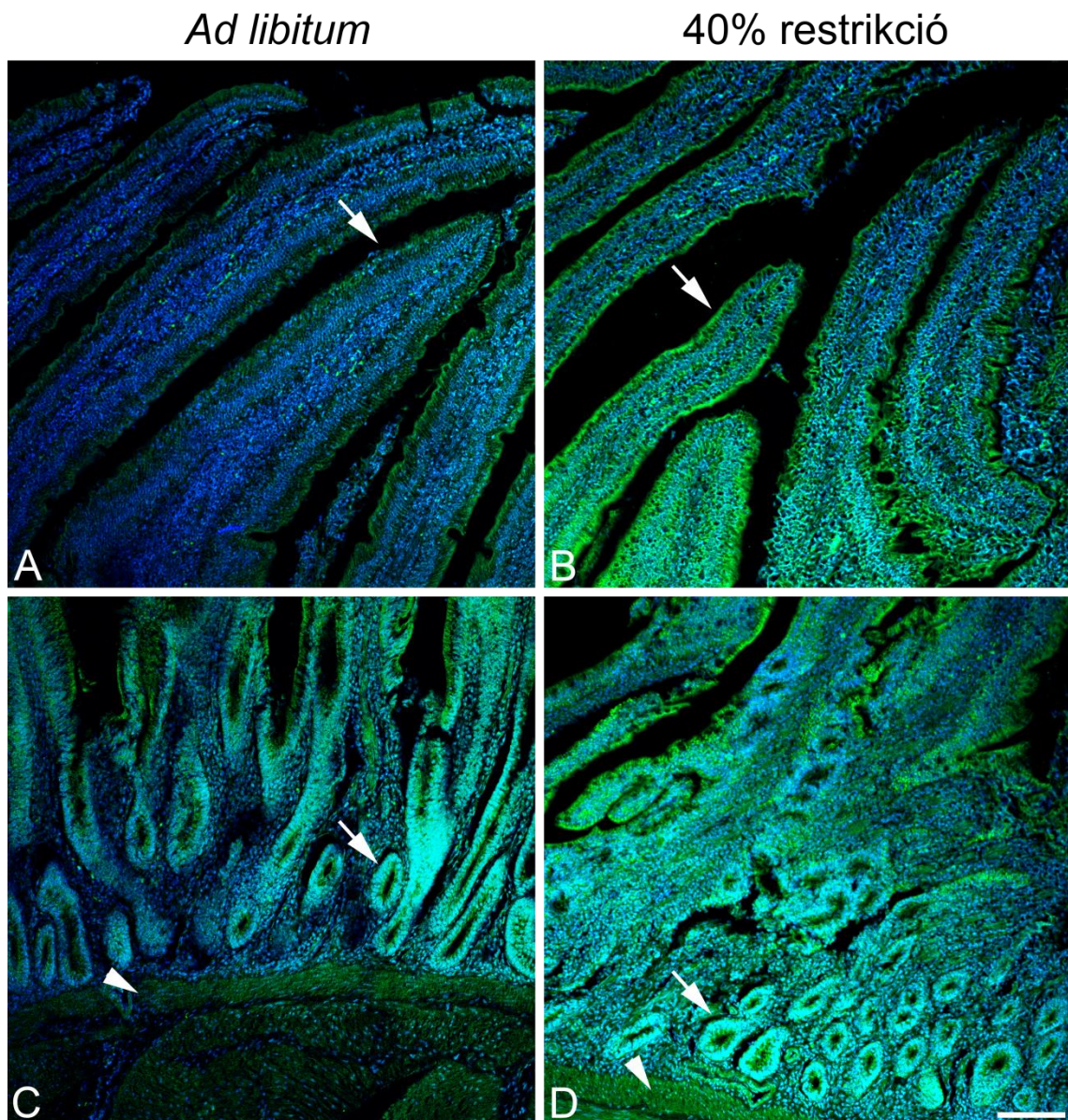
viselkedésminta	<i>ad libitum</i>	40% restrikcó	<i>P</i>
evés	6,25 \pm 0,4	5,3 \pm 0,25	0,492
faroktollak csipkedése	0,31 \pm 0,07	0,56 \pm 0,07	0,376
ivás*	3,63\pm0,29	1,5\pm0,09	0,025
kapirgálás	1,31 \pm 0,18	1,3 \pm 0,13	1,000
padlózat csipkedése	3,44 \pm 0,35	8 \pm 0,71	0,060
pihenés	0,31 \pm 0,06	0,94 \pm 0,17	0,235
rács csipkedése	1,94 \pm 0,3	4,69 \pm 0,76	0,252
séta	6,06 \pm 0,36	7,44 \pm 0,74	0,564
szárny nyújtás	0,38 \pm 0,06	0,13 \pm 0,03	0,179
takarmánykeresés	3 \pm 0,26	4,3 \pm 0,48	0,434
tollázkodás	0,81 \pm 0,11	1,13 \pm 0,13	0,532



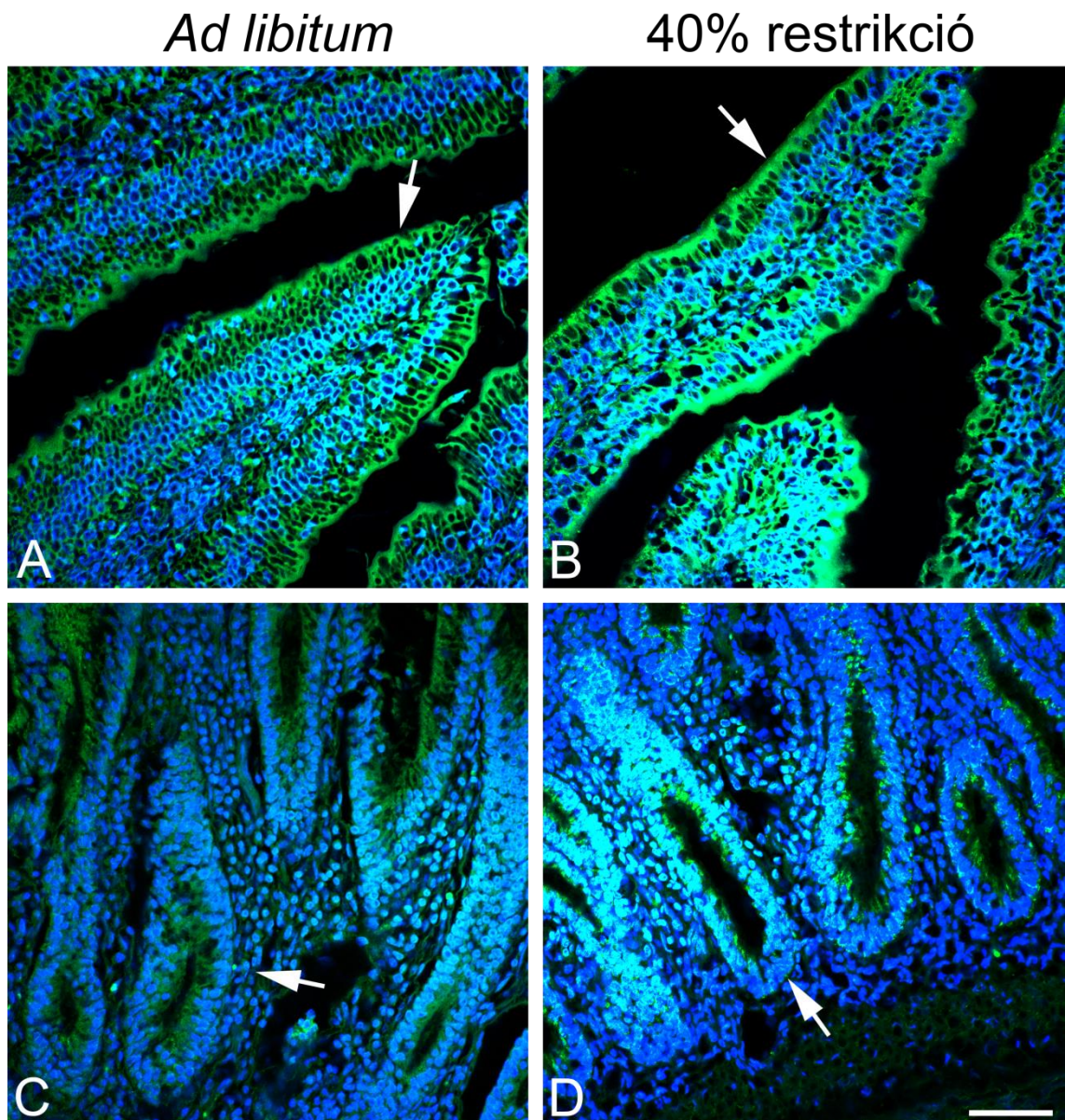
9. ábra: A mirigyes gyomor (A) és az éhbél (B) INSRα western blot módszerrel mért relatív fehérje szintjei a két kísérleti csoportban. Az átlag \pm SEM értékeket jelenítettem meg.



10. ábra: A takarmánymegvonás fokozta az INSR α szöveti expressziót a mirigyes gyomor szubmukozális mirigyeiben. A képek az INSR α szöveti kifejeződését mutatják be a mirigyes gyomormintákon az *ad libitum* (A, C) és a 40% takarmánymegvonás csoportban (B, D). A mukóza esetén, közepes immunreakciót találtam az epitéliumban (nyilak, A) ami hasonló volt a 40% takarmánymegvonáséhoz (nyilak, B) csoport. A sejtmagban az immunreaktív jel szubmukóza (C) mirigyek epitéliuma esetén erősebb volt a takarmánykorlátozott (D) csoportban. Zöld: INSR α , kék: DAPI, skála: 40 μ m.



11. ábra: Az $INSR\alpha$ eltérően expresszálódik az éhbélben a két csoport között. Az $INSR\alpha$ -specifikus jel a villusok epitéliumában (nyilak A, B), illetve a kriptákban (nyilak C, D) volt megtalálható. Gyenge immunreakciót mutatott a lamina propria és a szubmukóza, ami azonban kifejezettebb volt a takarmánykorlátozott csoportban (nyilak C, D). Zöld: $INSR\alpha$, kék: DAPI, skála: 100 μ m.



12. ábra: A 40%-os takarmánykorlátozás fokozta az INSR α kifejeződést az éhbélben. Itt a 11. ábra tovább nagyított képe látható. A takarmánykorlátozás az epitélium esetén (nyíl, B) intenzívebb immunpozitív jelet adott az *ad libitum* csoporthoz képest (nyíl, A). Az immunreakció intenzitása a kripta sejtek magjában (nyíl, D) kifejezettebb volt a takarmánymegvont csoportban, mint az *ad libitum* csoportban (nyíl, C). Zöld: INSR α , kék: DAPI, skála: 40 μ m.

8. táblázat: Az INSR α immunpozitív jelek szubjektív pontozása

mirigyes gyomor	<i>ad libitum</i>	40% restriktció
epitélium	++	+++
izomréteg	+	+
kötőszöveti réteg	+	+
szubmukóza mirigyek	+	++
éhbél	<i>ad libitum</i>	40% restriktció
epitélium	++	+++
izomréteg	++	++
kötőszöveti réteg	-	-
kripták	++	+++
muscularis externa	+	+
szubmukóza	-	-

A stabil élősúly fenntartásában a központi idegrendszeren belül a hipotalamusznak van integráló szerepe. Takarmánykorlátozás esetén a legpotensebb orexigén peptideket (AgRP/NPY) kódoló gének expressziója megnő a madarak hipotalamuszában (Boswell, 2005). Házityúk esetén a PACAP-38 agyüregi injektálása csökkent takarmányfelvételhez vezet a napos pecsenyecsirkék esetén (Tachibana és mtsai., 2003), illetve konzervált funkciója miatt alacsonyabb rendű gerincesekben is hasonló hatást fejt ki (Matsuda és mtsai., 2006). A takarmányfelvétel az endogén PACAP peptidszintjét is befolyásolja. A 36 órás takarmánymegvonás növeli a PACAP peptid koncentrációját a brojlercsirke hipotalamuszában, agytörzsében és a végagyában, majd visszatért a normál szintre 84 óra elteltével (Józsa és mtsai., 2005). Hasonló változásokat írtak le emlősök esetén is (Kiss és mtsai., 2007). A házityúk és emlősök esetén az inzulin az anabolizmus szabályzó hormonja az olyan INSR expresszáló szövetekben, mint a máj, harántcsíkolt izom és a zsírszövet (Dupont és mtsai., 2009). Az inzulin hatását a hipotalamikus inzulinreceptoron kifejtve befolyásolhatja a takarmányfelvétel alakulását (Shiraishi és mtsai., 2011a). Az INSR más agyterületeken és a perifériás szövetekben is megtalálható eddig nem tisztázott szereppel (Andres és mtsai., 2015; Unger és mtsai., 1991). Az INSR hiány esetén a vastagbél epitélium apoptózisa fokozódik (Santoro és mtsai., 2015). A 24 órás takarmánymegvonás hatására az INSR csökkent szintje volt mérhető a hipotalamuszban (Shiraishi és mtsai., 2011a).

Eredményeim alapján megállapítható, hogy az INSR α jelen van a házityúk mirigyes gyomrában és éhbelében, kifejeződése fokozódik a takarmánymegvonás hatására. A változás a mirigyes gyomor epitéliumban és a vékonybél epitéliumban, valamint kriptákban figyelhető meg.

A kísérletem 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 jelentős 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 (Ding és mtsai., 2014; Pirone és mtsai., 2011) és 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. Más kísérletekben is leírták a *PAC1* az *ADCYAP1*-től eltérő expresszióját (Lam és mtsai., 2012). Feltételezem, hogy a PACAP koncentrációjának növekedése a mirigyes gyomorban a csökkent takarmánymennyiség hatására bekövetkező csökkenő motilitásnak tudható be. Bizonyos perifériás peptidok felszabadulásukat követően a véráramba kerülve elérik a receptorukat az agyban (Honda és mtsai., 2017). A PACAP, a többi peptidhez hasonlóan (Van Dorpe és mtsai., 2012) képes átjutni a vér-agy gáton (Dogrukol-Ak és mtsai., 2004). 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.

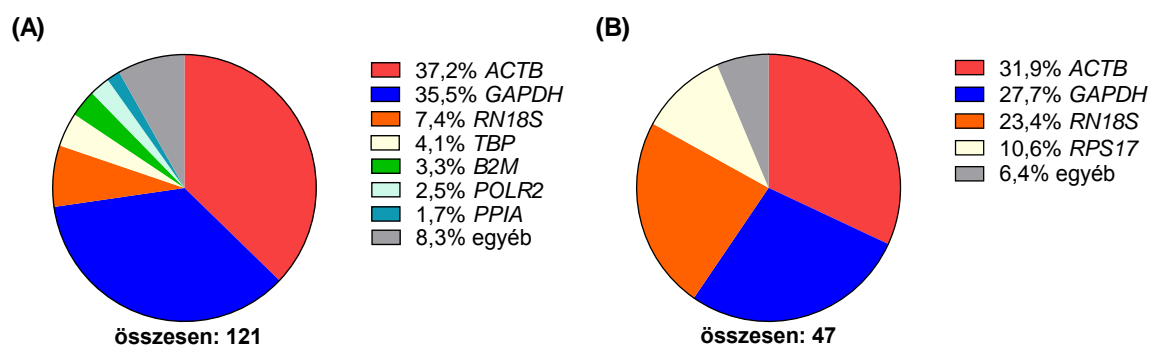
A galanin ICV injektálása fokozza a takarmányfelvételt emlősök és madarak esetén is (Ando és mtsai., 2000; Hagen és mtsai., 2013; Tachibana és mtsai., 2008), habár az endogén mRNS szint nem minden esetben változik éhezés hatására (Kumano és mtsai., 2003). A galanin immunhisztokémiás vizsgálata a házityúk 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 közép bél esetén (DeGolier és mtsai., 1999).

A viselkedést tekintve az eredményeim egyeznek a szakirodalomban megfigyeltekkel, a tojótípusú házityúk vízfelvételének csökkenése volt megfigyelhető takarmánymegvonás után (Webster, 1995). Jelenleg még keveset tudunk a NMU házityúkban betöltött funkciójáról, a patkány NMU injektálása csökkenti a takarmányfelvételt a tojó- (Kamisoyama és mtsai., 2007) és a brojlercsirkében (Honda és mtsai., 2015), valamint fokozza a tolláshozzás viselkedés mintákat. Az NMU, a házityúk gasztrointesztinális rendszerében betöltött szerepéről még keveset tudunk, habár ismert, hogy az emlős NMU begy simaizomzatára kontraktor hatással bír (Okimura és mtsai., 1992). A tollazathoz köthető viselkedésmintázatokban nem mértem változásokat, valamint a hipotalamuszban sem történt génexpressziós változás az *NMU* kifejeződését illetően. Az éhbélben megfigyelt *NMU* expresszió-növekedés feltételezéseim szerint a takarmánykorlátozás hatására megváltozott motilitáshoz köthető (Clench és mtsai., 1995).

4.2 Stabilan kifejeződő referenciagének kiválasztása a brojlercsirke hipotalamuszában, különböző táplálóanyag-ellátottság mellett

4.2.1 Referenciagének a házityúk génexpressziós vizsgálatokban

A feldolgozott ($n=100$) publikációk közül (6. melléklet), 12% állította azt, hogy az alkalmazott referenciagén stabilan fejeződik ki az adott kísérleti körülmény(ek) alatt, de ezek közül csupán három használt stabilitásvizsgáló eljárást (geNorm és NormFinder módszerekkel) ennek igazolására. Ezzel szemben a publikációk 88%-a nem foglalkozott a használt referenciagének stabilitásának vizsgálatával (vagy legalábbis nem közölték azt). A leggyakrabban normalizáláshoz használt gének az *ACTB*, *GAPDH* és az *RN18S*, volt 37,2, 35,5, illetve 7,4%-os aránnyal (13. ábra). A kísérletek 87%-a egyetlen referenciagént használt a normalizációhoz, 9%-a kettőt, 2%-a hármat, 1% ötöt és 1%-a hatot (6. melléklet). A takarmánymegvonás kísérletek ($n=42$) 19%-a állította azt, hogy az alkalmazott referenciagén stabilan fejeződik ki az adott kísérleti körülmény(ek) alatt, de egyedül egy szolgált erre bizonyítékkal (geNorm módszer). Ezzel szemben 81%-a nem foglalkozott a használt referenciagének stabilitásának vizsgálatával (vagy legalábbis nem közölték azt). A leggyakrabban normalizáláshoz használt gének ebben az esetben is az *ACTB*, *GAPDH* és az *RN18S* voltak 31,9, 27,7 és 23,4 százalékos arányban. A közlemények 9,5%-a két referenciagént használt a normalizációhoz, míg 90,5%-a egyet (7. melléklet).



13. ábra: A publikációkban használt referenciagének aránya. Az eredményeim szerint az *ACTB*, *GAPDH* és az *RN18S* a leggyakrabban használtak a házityúk qPCR génexpressziós tanulmányokban általában (A) és az *ad libitum*-takarmánymegvonás kísérletekben is (B).

Leíró jelleggel megvizsgáltam a 10 referenciagén-jelölt expresszióját a hipotalamuszban a Cq értékek alapján *ad libitum*, 24 óra éhezés, 24 éhezés majd 2 óra

újraetetés körülmények között. Összevont kísérleti körülmények között (összesen 24 Cq-al, minden csoportból összevonva) azt találtam, hogy az *RN18S* mutatja a legnagyobb expressziót (Cq: 6,54) míg a legkisebb mértékben (Cq: 23,87) a *TBP* fejeződik ki a házityúk hipotalamuszában (8. melléklet és 9. táblázat). A leíró statisztika alapján a *TBP* kifejeződése mutatta a legkisebb varianciát (CV=1,25%) és az *RN18S* a legnagyobbat (CV=6,62%).

9. táblázat: A referenciagén-jelöltek leíró statisztikája, BestKeeper módszerrel

gén	n	geo. átlag (Cq)	átlag (Cq)	min. (Cq)	max. (Cq)	SD (±Cq)	CV (%Cq)	r
<i>ACTB</i>	24	18,17	18,17	17	19,19	0,44	2,42	0,908
<i>B2M</i>	24	21,21	21,22	19,71	22,94	0,66	3,09	0,848
<i>GAPDH</i>	24	16,35	16,36	15,65	17,17	0,34	2,11	0,737
<i>HMBS</i>	24	21,42	21,42	20,61	22,24	0,34	1,61	0,763
<i>LBR</i>	24	22,47	22,48	21,55	23,76	0,47	2,09	0,88
<i>POLR2B</i>	24	22,3	22,3	21,47	22,85	0,33	1,48	0,681
<i>RN18S</i>	24	7,33	7,36	6,54	9,48	0,49	6,62	0,741
<i>RPS17</i>	24	18,8	18,8	17,95	19,47	0,3	1,61	0,8
<i>TBP</i>	24	23,18	23,18	22,36	23,87	0,29	1,25	0,825
<i>YWHAZ</i>	24	19,44	19,45	18,66	20,66	0,47	2,4	0,718

n: mintaszám; geo. átlag: mértani közép; átlag: számtani átlag; min. és max.: minimum és maximum Cq értékek; SD: szórás; CV: variációs együttható; r: Pearson korrelációs koefficiens a BestKeeper indexel.

4.2.2 A referenciagén-jelöltek expressziós stabilitása

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 legnagyobb korrelációt a BestKeeper indexel az *ACTB* (0,908) míg a legkisebbet a *POLR2B* (0,681) esetén kaptam. A három stabilitási érték alapján kapott rangsort a 10. 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.

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

gén	végző rang ¹	Best-Keeper ²	geNorm	Chervoneva és mtsai. (2010)	Norm-Finder	ΔCt 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, ²A BestKeeper részeredményeket a 11. táblázat foglalja össze. ³stabilitási érték.

A Chervoneva és mtsai. (2010) által közölt módszer alapján a legkisebb stabilitási értékkel a *TBP* (8,42) és a második legkisebbel a *POLR2B* (36,32) bírt így a legstabilabbnak tekinthetőek. A legkisebb stabilitási értéket a *POLR2B* (0,096) és a *GAPDH* (0,103) génekhez rendelt a NormFinder elemzés. Az *RN18S* (0,189) és a *B2M* (0,220) kapta a legnagyobb értékeket, ami alacsony expressziós stabilitást jelent a többi jelölthöz képest. Az összehasonlító ΔCt módszer alapján a *TBP* (0,39) és az *RPS17* (0,40) kapta a legkisebb stabilitási értéket (átlagolt szórás), míg az *RN18S* (0,69) és a *B2M* (0,65) lett a leginstabilabb. A különböző módszerekkel kapott rangsorok korrelációelemzés eredményét a 12. táblázatban mutatom be. A rangsorok minden esetben pozitív korrelációt ($r > 0,7$) mutattak, azt jelezvén, hogy az egyes módszerek által felállított rangsorok hasonlóak. Az egyes kísérleti beállításokkal kapott rangsorokat a 11. táblázatban mutatom be. A *TBP* minden összehasonlításban a legstabilabbnak bizonyult. Összevont körülmények között a *TBP* és *POLR2B* volt a legstabilabb, míg a *B2M* és *RN18S* a leginstabilabb.

11. táblázat: Az egyes kísérleti beállításokkal kapott rangsorok

<i>ad libitum</i> és 24 óra takarmánymegvonás							
gén	rang	BestKeeper	geNorm	Chervoneva és mtsai. (2010)	Norm-Finder	Δ Ct módszer	
<i>ACTB</i>	5	3 (0,38; 2,08; 0,934) ¹	5 (0,266)	6 (564,31)	1 (0,037)	5 (0,47)	
<i>B2M</i>	9	8 (0,61; 2,85; 0,881)	8 (0,374)	9 (909,48)	6 (0,061)	9 (0,73)	
<i>GAPDH</i>	6	7 (0,36; 2,22; 0,785)	3 (0,229)	8 (697,59)	2 (0,042)	6 (0,48)	
<i>HMBS</i>	4	6 (0,34; 1,59; 0,721)	1 (0,218)	4 (288,67)	5 (0,057)	3 (0,45)	
<i>LBR</i>	7	5 (0,45; 2,00; 0,925)	7 (0,321)	5 (532,35)	6 (0,061)	7 (0,53)	
<i>POLR2B</i>	3	4 (0,30; 1,35; 0,523)	2 (0,223)	2 (51,84)	5 (0,057)	4 (0,46)	
<i>RN18S</i>	10	10 (0,59; 7,97; 0,738)	9 (0,457)	10 (1023)	8 (0,105)	10 (0,77)	
<i>RPS17</i>	2	2 (0,28; 1,52; 0,848)	1 (0,218)	3 (154,59)	4 (0,056)	2 (0,45)	
<i>TBP</i>	1	1 (0,23; 0,99; 0,832)	4 (0,243)	1 (2,84)	3 (0,051)	1 (0,44)	
<i>YWHAZ</i>	8	9 (0,40; 2,07; 0,694)	6 (0,289)	7 (582,84)	7 (0,063)	8 (0,55)	
24 óra takarmánymegvonás és 24 óra takarmánymegvonás-2 óra újraetetés							
<i>ACTB</i>	4	1 (0,42; 2,32; 0,924)	6 (0,349)	7 (838,69)	7 (0,146)	5 (0,44)	
<i>B2M</i>	8	7 (0,57; 2,74; 0,813)	8 (0,432)	9 (975,61)	10 (0,195)	9 (0,63)	
<i>GAPDH</i>	6	9 (0,37; 2,30; 0,664)	4 (0,276)	6 (689,94)	4 (0,123)	6 (0,46)	
<i>HMBS</i>	3	8 (0,33; 1,55; 0,701)	1 (0,208)	3 (199,84)	5 (0,129)	3 (0,42)	
<i>LBR</i>	4	2 (0,43; 1,91; 0,833)	7 (0,378)	5 (378,76)	3 (0,122)	7 (0,49)	
<i>POLR2B</i>	2	5 (0,32; 1,43; 0,749)	1 (0,208)	2 (73,23)	1 (0,085)	2 (0,40)	
<i>RN18S</i>	9	10 (0,43; 5,85; 0,700)	9 (0,481)	10 (1022,92)	9 (0,179)	10 (0,67)	
<i>RPS17</i>	5	6 (0,33; 1,75; 0,758)	3 (0,225)	4 (372,45)	8 (0,151)	4 (0,42)	
<i>TBP</i>	1	3 (0,30; 1,30; 0,800)	2 (0,218)	1 (43,94)	2 (0,103)	1 (0,40)	
<i>YWHAZ</i>	7	4 (0,56; 2,88; 0,821)	5 (0,314)	8 (891,8)	6 (0,144)	8 (0,49)	
<i>ad libitum</i> és 24 óra takarmánymegvonás-2 óra újraetetés							
<i>ACTB</i>	6	2 (0,46; 2,53; 0,891)	6 (0,333)	8 (790,68)	6 (0,159)	6 (0,42)	
<i>B2M</i>	9	6 (0,68; 3,22; 0,847)	9 (0,459)	9 (995,57)	10 (0,298)	10 (0,67)	
<i>GAPDH</i>	5	7 (0,28; 1,68; 0,777)	4 (0,267)	5 (257,71)	3 (0,106)	5 (0,42)	
<i>HMBS</i>	2	5 (0,35; 1,64; 0,861)	2 (0,206)	3 (187,76)	1 (0,085)	2 (0,37)	
<i>LBR</i>	7	3 (0,49; 2,16; 0,872)	7 (0,362)	6 (625,73)	7 (0,167)	7 (0,47)	
<i>POLR2B</i>	4	8 (0,35; 1,56; 0,73)	3 (0,234)	2 (99,24)	2 (0,095)	4 (0,41)	
<i>RN18S</i>	10	9 (0,45; 6,20; 0,824)	8 (0,406)	10 (1023)	8 (0,188)	9 (0,57)	
<i>RPS17</i>	3	4 (0,27; 1,45; 0,843)	1 (0,171)	4 (192,8)	4 (0,128)	3 (0,38)	
<i>TBP</i>	1	1 (0,33; 1,42; 0,872)	1 (0,171)	1 (71,35)	5 (0,133)	1 (0,37)	
<i>YWHAZ</i>	8	10 (0,43; 2,23; 0,678)	5 (0,303)	7 (641,78)	9 (0,219)	8 (0,50)	

¹stabilitási érték

12. táblázat: Spearman korrelációs mátrix az öt módszerrel kapott rangok alapján

módszer	BestKeeper	geNorm	Chervoneva és mtsai. (2010)	NormFinder	Δ Ct módszer
BestKeeper	1	0,705 (0,023) ¹	0,709 (0,022)	0,576 (0,082)	0,830 (0,003)
geNorm		1	0,863 (0,001)	0,748 (0,013)	0,960 (<0,001)
Chervoneva és mtsai. (2010)			1	0,794 (0,006)	0,891 (0,001)
NormFinder				1	0,794 (0,006)
Δ Ct módszer					1

¹P érték a zárójelben feltüntetve.

Az *ad libitum*-takarmánymegvonás-újraetetés kísérleti körülményeket gyakran használják a takarmányfelvételt szabályzó peptideket kódoló gének, a szénhidrát- és zsírsanyagcsere és az izomélettan vizsgálatokhoz. A kvantitatív valós-idejű polimeráz láncreakció különösen alkalmas a neuropeptidek kifejeződésének tanulmányozására, amik általában kis mértékben fejeződnek ki és a kereskedelemben kapható antitestek nem minden esetben állnak rendelkezésre a peptid szintű vizsgálatukhoz. A qPCR eredményeket technikai variáció terheli, ami az esetleges kis, de jelentős génexpressziós különbségeket elrejtheti. A normalizálásnak nevezett módszerrel ezek a technikai eredetű variációk kiküszöbölhetőek.

Ehhez legtöbbször referenciagéneket használunk, azonban kritérium, hogy ezek kifejeződése független legyen a kísérleti körülményektől. Megvizsgáltam, hogy a kiválasztott, házityúk génexpresszióval foglalkozó közleményekben ($n=142$) melyek a normalizációs trendek. Megállapítható, hogy mindegyik közlemény referenciagént használt a normalizációhoz, azonban ezek csak elenyésző része foglalkozott azok stabilitásával. Ehelyett a leggyakrabban az *ACTB*, *GAPDH* és az *RN18S* használják a normalizációhoz, feltételezve, hogy kifejeződésük független az adott kísérleti körülménytől. Jelenleg elenyésző számú közlemény (3. táblázat) foglalkozik a házityúk esetén a referenciagének stabilitásával. Borowska és mtsai. (2016) 6 referenciagén-jelölt stabilitását vizsgálta meg, többek között a *GAPDH* és az *ACTB* is a házityúk limfoid szerveiben különböző mitogén stimulusk hatását vizsgálva. A *GAPDH* és *TBP* bizonyult a két legstabilabbnak ezen körülmények alatt, míg az *ACTB* a

leginstabilabbnak. De Boever és mtsai. (2008) azt találta, hogy a *GAPDH* használata kerülendő a limfociták gyulladásos citokininek kifejeződésének vizsgálatakor lipopoliszacharid kezelést követően. A vírus fertőzött házityúk tüdő sejtek esetén az *RNI8S* a legstabilabb, míg az *ACTB* és *GADPH* kifejeződése érintetté vált (Kuchipudi és mtsai., 2012). Nascimento és mtsai. (2015) 13 referenciagén-jelölt stabilitását vizsgálta házityúk mellizmában, különböző lizin takarmány-kiegészítések hatására és azt találták a *ACTB* és *GAPDH* használata előnytelen lehet olyan, kevésbé használt referenciagénekkel szemben, mint a *HMBS* vagy a *HPRT1* amik expressziós stabilitásukat megőrzik az említett kísérleti beállítás alatt. Az említett példák is azt szemléltetik, hogy a leggyakrabban használt referenciagének kifejeződése nem minden kísérleti körülmény között tekinthető stabilnak, azokat nem ajánlott univerzálisan használni.

Eredményeim 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 az összevont- és a három kísérleti körülmény kombinálásában is (13. táblázat). 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. A második legstabilabb kifejeződésű a *POLR2B* az RNS polimeráz II második legnagyobb fehérje komponensét kódolja, így elengedhetetlen az eukarióta sejt mRNS szintéziséhez (Boeger és mtsai., 2005; Tora, 2002). A három leggyakrabban használt referenciagén közül az *ACTB* és *GAPDH* közepes expressziós stabilitást mutatott, míg az *RNI8S* volt a legkevésbé stabil ezen körülmények között ezért nem ajánlatos használata a normalizációhoz. Az *RNI8S* a 18S riboszómális RNS-t kódolja (rRNS), nagyobb mértékben fejeződik ki a legtöbb mRNS-el szemben (a 28S rRNS-el képzik a totálRNS legnagyobb hányadát). Az átírását az RNS polimeráz I végzi (míg a többi referenciagén jelöltét a II), ami független szabályzási lehetőségeknek ad teret (Radonić és mtsai., 2004).

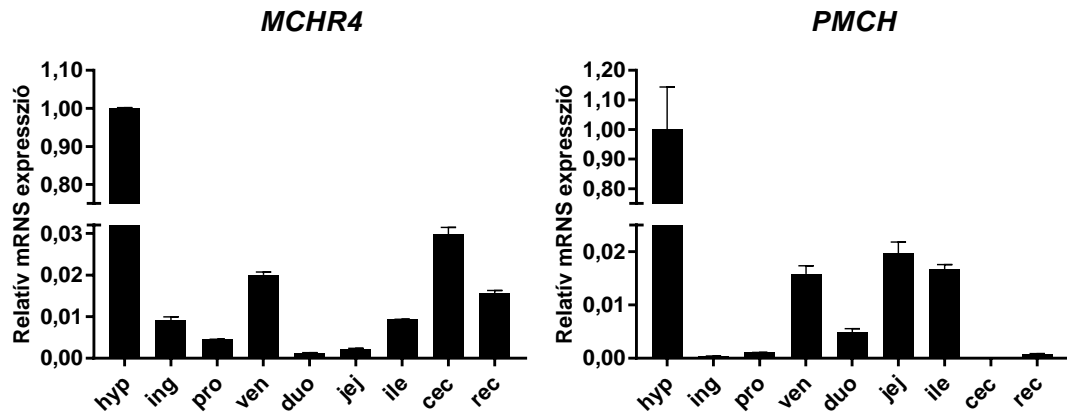
13. táblázat: A referenciagének stabilitása a hipotalamuszban, a különböző beállításokban

gén	összevont	<i>ad libitum</i>	F24h	F24hRF2h
<i>ACTB</i>	6	5	4	6
<i>B2M</i>	9	9	8	9
<i>GAPDH</i>	5	6	6	5
<i>HMBS</i>	4	4	3	2
<i>LBR</i>	7	7	4	7
<i>POLR2B</i>	2	3	2	4
<i>RNI8S</i>	10	10	9	10
<i>RPS17</i>	3	2	5	3
<i>TBP</i>	1	1	1	1
<i>YWHAZ</i>	8	8	7	8

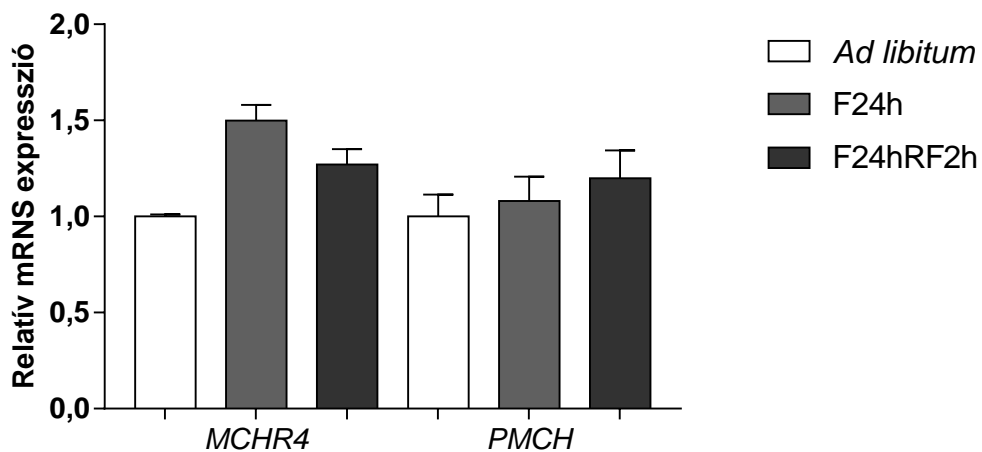
4.3 A takarmánymegvonás-újraetetés és a növekedés hatása a brojlercsirke MCH gén kifejeződésére, az *MCHR4* és *PMCH* expresszió szövetek közti vizsgálata

4.3.1 Az *MCHR4* és *PMCH* mRNS szöveti eloszlása, a takarmánymegvonás-újraetetés hatása a két gén expressziójára

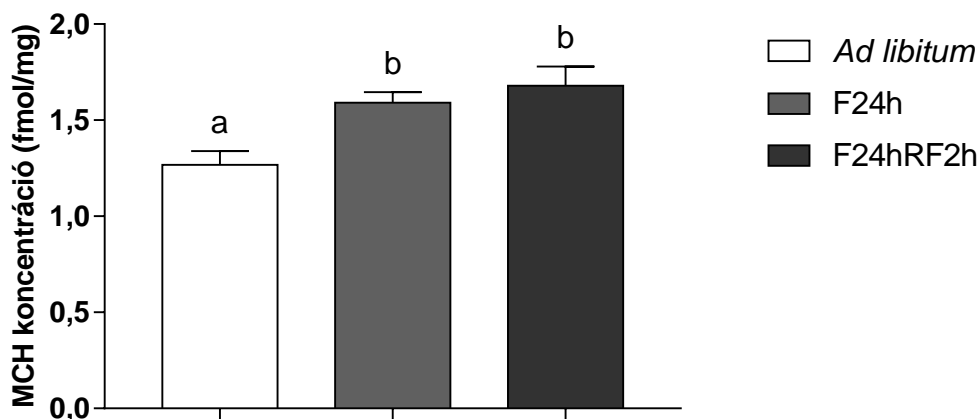
Első lépésként megállapítottam, hogy az 4.2 fejezetben részletezett referenciagének közül melyik a legalkalmasabb a normalizációhoz a hipotalamuszban a növekedési változások követéséhez. Az eredmények alapján az *ACTB* használtam a normalizációhoz (16. táblázat). Az *MCHR4* és *PMCH* gének kifejeződését megvizsgáltam a hipotalamuszban és a gasztrointesztinális rendszer mentén (14. ábra). A *PMCH* közepes expressziót mutatott a hipotalamuszban, míg az *MCHR4* alacsony (Cq átlag 28, illetve 37). Minimális génexpressziót mértem mindkét gén esetén a gasztrointesztinum mentén (Cq>34), ami azt jelzi, hogy a két gén kifejeződése a központi idegrendszerre korlátozódik. A *PMCH* nem fejeződött ki a vakbélben. Megmértem az *MCHR4* és *PMCH* expressziót az *ad libitum*, 24 óra éhezés és 24 óra éhezés-2 óra újraetetés csoportokban qPCR módszerrel, valamint az MCH peptid szintjét radioimmunszé módszerrel. Nem találtam különbséget ($P=0,9730$) a három kísérleti csoport között az élősúly tekintetében a kísérlet kezdetén, ami $1326\pm 85,25$, $1325\pm 64,76$ és $1344\pm 21,29$ (g, átlag \pm SEM) volt az *ad libitum*, az F24h, illetve az F24hRF2h csoportokban. A kísérlet végén az F24h csoport élősúlya csökkent ($P=0,0135$) az *ad libitum* csoporthoz képest, de nem volt különbség a többi összehasonlításban. A varianciaelemzés alapján az éhezés-újraetetés nem befolyásolta a két célgén mRNS szintjét (15. 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 (16. 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).



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



15. 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.



16. 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.

4.3.2 Az *MCHR4* és *PMCH* kifejeződés növekedés függése, korrelációelemzés a fenotípusos paraméterekkel

A hasüregi zsír változását, az élősúlyt és a hasüregi zsír az élősúly %-ban kifejezett arányát a 14. táblázat tartalmazza. A hasüregi zsír tömege nőtt 21 nap elteltével a 7-14 napos korhoz képest, 21 napos kor után is növekedett az előző állapotokhoz képest. A zsírszövet tömege a 35. napon elérte az élősúly 1,58%-át. 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 (17. ábra). A lineáris trendelemzés 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 peptidkoncentrációk változása nem volt jelentős ($P>0,05$) de itt is csökkenő trend figyelhető meg (-0,0848 és $P=0,0027$) a növekedés függvényében, az inzulinkoncentráció növekvő trendet (0,5336 és $P=0,0119$) mutatott az első héthez képest a kísérlet végeztével (18. ábra). 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 (15. táblázat).

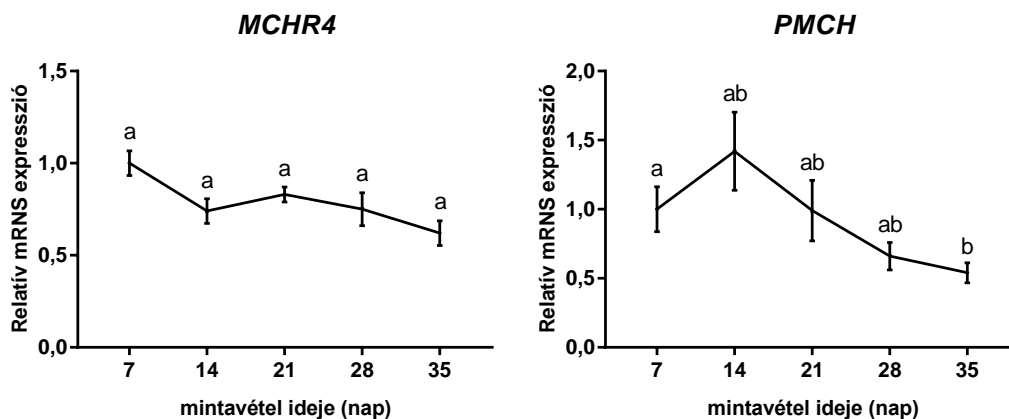
14. táblázat: Az élősúly és hasüregi zsír változása a növekedés függvényében. Az átlag \pm SEM értékeket jelenítettem meg

	életkor (nap)				
	7	14	21	28	35
élősúly (g)	148,1 \pm 3,46 ^a	311,6 \pm 12,2 ^a	595,1 \pm 22,8 ^b	1401 \pm 60,0 ^c	1573 \pm 64,3 ^d
hasüregi zsír (g)	1,05 \pm 0,10 ^a	3,6 \pm 0,24 ^a	9,24 \pm 0,62 ^b	20,1 \pm 0,9 ^c	24,8 \pm 1,3 ^d
zsír (%)	0,708 \pm 0,065 ^a	1,16 \pm 0,066 ^b	1,56 \pm 0,11 ^c	1,44 \pm 0,06 ^{bc}	1,58 \pm 0,08 ^c

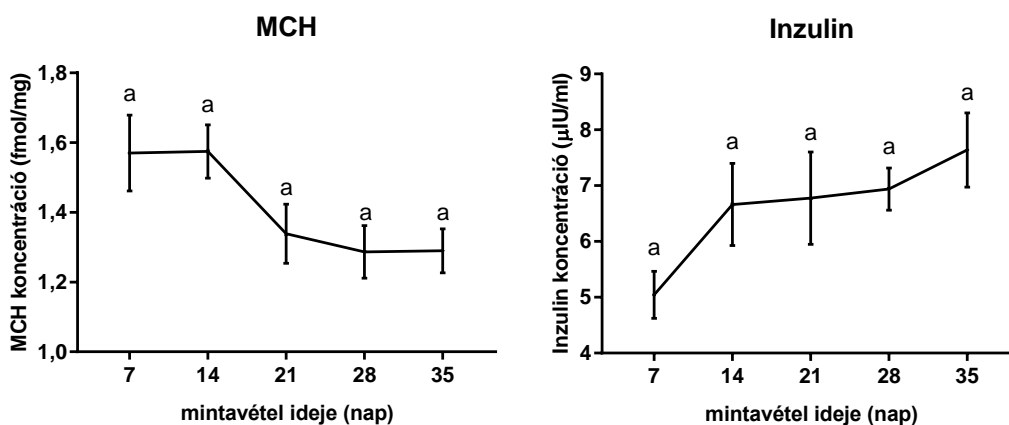
15. táblázat: A mért paraméterek Spearman korrelációelemzése

	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



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



18. ábra: Az MCH koncentráció a hipotalamuszban, illetve a vérplazma inzulin változása a növekedés függvényében. Az MCH koncentrációt fmol/mg szövettömegben fejeztem ki. Az átlag \pm SEM értékeket jelenítettem meg.

16. táblázat: A referenciagén-jelöltek stabilitása a növekedés hatására

gén	végső rang	Best-Keeper	geNorm	Chervoneva és mtsai. (2010)	Norm-Finder	Δ Ct módszer
<i>ACTB</i>	1	3 (3,48) ¹	3 (0,820)	9 (622,33)	1 (0,056)	1 (1,031)
<i>B2M</i>	9	9 (7,27)	6 (0,996)	7 (593,88)	8 (0,098)	3 (1,216)
<i>GAPDH</i>	7	6 (5,13)	1 (0,335)	10 (770,16)	5 (0,089)	10 (2,227)
<i>HMBS</i>	4	4 (4,31)	1 (0,335)	4 (306,36)	7 (0,093)	9 (2,160)
<i>LBR</i>	3	7 (6,00)	2 (0,701)	8 (611,00)	2 (0,057)	2 (1,171)
<i>POLR2</i>	2	1 (1,26)	7 (1,084)	1 (1,26)	9 (0,115)	6 (1,312)
<i>RN18S</i>	10	10 (8,88)	9 (1,227)	10 (1023,00)	10 (0,119)	8 (1,764)
<i>RPS17</i>	5	2 (3,30)	8 (1,134)	2 (3,21)	6 (0,090)	7 (1,447)
<i>TBP</i>	8	8 (6,54)	5 (0,950)	6 (463,65)	3 (0,059)	5 (1,283)
<i>YWHAZ</i>	6	5 (4,48)	4 (0,884)	5 (381,05)	4 (0,089)	4 (1,217)

¹stabilitási érték zárójelben

Az MCH peptid szekvenciája nagyfokú konzerváltságot mutat mind az emlős és madár fajok között (3. ábra). Az evolúciósan megőrzött peptid szekvencia arra enged következtetni, hogy az MCH-nak hasonló szerepe van a takarmányfelvétel szabályozásában a házityúk és az emlősök esetén is. A takarmánymegvonás-újraetetés kísérletekkel befolyásolhatjuk az étvágy szabályzó neuropeptideket kódoló gének kifejeződését (Cui és mtsai., 2017). Hipotézisem szerint az MCH peptid kifejeződése, mivel orexigén hatású peptid és nagyfokú konzerváltságot mutat, éhezés hatására fokozódni fog. Továbbá arra is kíváncsi voltam, hogy az *MCHR4* és *PMCH* szöveti kifejeződése hogyan alakulnak. A központi idegrendszeren kívül az *MCHR4* és *PMCH* mRNS a lép és ivarszerveket kivéve, alig volt detektálható tojótípusú házityúk esetén (Cui és mtsai., 2017). Az eredményeim alapján hasonló következtetésre jutottam, mivel a két transzkriptum a hipotalamuszban mértékhez képest a gasztrointesztinális rendszerben alig expresszáldott, ezért feltételezhető, hogy az MCH konzervált szereppel bírhat (takarmányfelvétel szabályzás) a házityúk esetén is.

Az MCH peptid a 3 napos brojlersirkék injektálását követően nem okozott növekedést a takarmányfelvételben (Ando és mtsai., 2000). Habár ez nem jelzi, hogyan reagál az endogén mRNS vagy peptidszint a különböző táplálóanyag ellátottságra. Az MCH hipotalamikus lokalizációját házityúk esetén még nem írták le, habár emlős tanulmányok alapján ismert, hogy az MCH a laterális hipotalamusz másodrendű neuronjaiban fejeződik ki, az infundibuláris magokban nem írták az előfordulását. A tojótípusú házityúkkal végzett kísérletben a *PMCH* mRNS relatív szintje nagyobb volt a kis testsúlyra szelektált vonalban, mint fordított esetben, valamint a *PMCH* kifejeződés nem változott a 3 órás takarmánymegvonás hatására (Yi és mtsai., 2015). A 48 órás

éhezés növelte a *PMCH* mRNS relatív szintjét (1,5-szeresére), majd 24 óra újraetetés követően visszatért az *ad libitum* csoport szintjére (Song és mtsai., 2012). A *PMCH* kifejeződés úgy tűnik a takarmánymegvonás hosszától is függ. Nem találtam különbségeket az mRNS szintekben az *MCHR4* és a *PMCH* esetén. Az MCH koncentrációja 24 órás éhezést követően, majd a 2 órás újraetetés követően is növekedett az *ad libitum* csoporthoz képest. Ennek magyarázata lehet, hogy az éhezés hatására bekövetkezett negatív energiamérleg a viszonylag rövid újraetetés követően még nem állt helyre, ezt tükrözheti a fokozott MCH peptid (ami takarmányfelvételt fokozó, orexigén hatásáról ismert) koncentráció az étvágy szabályzó központban. Hasonló megállapításra jutott Zhou és mtsai (2005), akik az emlősökben egyik legjobban ismert étvágy szabályzó neuropeptid Y (NPY) koncentrációjának változását vizsgálták brojlercsirke hipotalamuszában különböző táplálékanyag ellátottság alatt. Az NPY koncentrációja emelkedett maradt a 48 órás takarmánymegvonás, illetve a 2 óra újraetetés követően is, szignifikáns csökkenést nem tapasztaltak. Az emlősök esetén a leptin az energiaraktárak állapotáról, az energiamérlegről visszajelzést adó legfontosabb hormon. Seroussi és mtsai. (2015) eredményei alapján a házityúk leptin inkább helyi hatással bírhat, alacsony plazmakoncentrációt mutat, továbbá az nem változik a zsírraktárak állapotával. Házityúk esetén az inzulin és glükóz a feltételezhető adipozitás szignálok. Elvégeztem ezek plazma koncentrációjának korreláció elemzését a hipotalamikus MCH koncentrációval, ám köztük szoros korrelációt nem találtam. A fokozott MCH koncentráció mégis arra enged következtetni, hogy a zsírraktárak állapotáról visszajelzést adó hormon jelenléte az emlősökhöz hasonlóan a házityúk keringésében is jelen van.

Az *MCHR4* és *PMCH* csökkenő trendet mutatott a növekedéssel a hipotalamuszban. Az eredményeim 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 brojlercsirke hipotalamuszában. Az NPY expressziója szintén csökkenő trendet mutat a növekedés előrehaladtával a tojócsirke 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.

Felételezem, hogy az MCH növekedéssel csökkenő kifejeződése a fokozódó hasüregi zsír tömegével összefüggésben lehet. A liposztát elmélet szerint a zsírszövet is részt vesz a takarmányfelvétel alakulásában, fokozódó tömege csökkenti azt (Baile és mtsai., 2000). Az emlősökben leírt, elsődlegesen a zsírszövet által termelt, annak mennyiségéről visszajelzést adó hormon a leptin. A zsírraktárak mennyiségének növekedésével fokozódik a vérplazma koncentrációja, ami a hipotalamusznak visszajelzést adva csökkenti a táplálék/takarmányfelvételt. Jelenlegi tudományos álláspont szerint a leptin a madarak esetén inkább helyi hatással bíró hormon (Seroussi és mtsai., 2015; Simon és mtsai., 2008). Az inzulin a házityúkban adipozitás szignálként működhet. A plazma inzulin koncentrációja fokozódik a testsúly növekedésével (Tokushima és mtsai., 2003) és befolyásolhatja az anorexigén neuropeptidok kifejeződését (Zhang és mtsai., 2015). Az inzulinreceptorokat szintén lokalizálták a házityúk hipotalamusz, infundibuláris magcsoportjaiban (Shiraishi és mtsai., 2011a). Az eredményeim alapján megállapítható, hogy az inzulin vérplazma koncentrációja fokozódott a növekedés előrehaladtával. Szignifikáns korrelációt nem találtam az MCH peptid hipotalamikus szintjével, ami azt jelezheti, hogy nincs kapcsolat a két peptid között az adipozitás tekintetében.

4.4 A takarmánymegvonás hatása a házityúk középbélének morfológiájára és az éhbélének proteomjára

4.4.1 A középbél morfológiái változása

A patkóbél esetén az éhezést követő újraetetés hatására a kripták mélysége 17%-al nőtt, míg a többi mért paraméterben nem tapasztaltam változást (17. táblázat). 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, az osztódásban lévő sejtek számának csökkenését, valamint mind a három középbél szakasz hosszának rövidülését írták le (Geyra és mtsai., 2001; Gonzales és mtsai., 2003). A középbél epitélium dinamikus változását figyelték meg a több napon át éheztetett tojótípusú tyúkokon. A patkóbél, éhbél, csípőbél szakaszokban mind a villusok magassága, mind pedig a villusok és azokban épp osztódásban lévő sejtek száma csökken az *ad libitum* takarmányozott csoporthoz képest. Újraetétést követően egy nappal, a morfológiái paraméterek visszaálltak a kontroll állapotban mért értékekhez, ezzel is jelezvén a középbél epitélium gyors reagálását az adott takarmányozási állapotra (Yamauchi és mtsai., 1996).

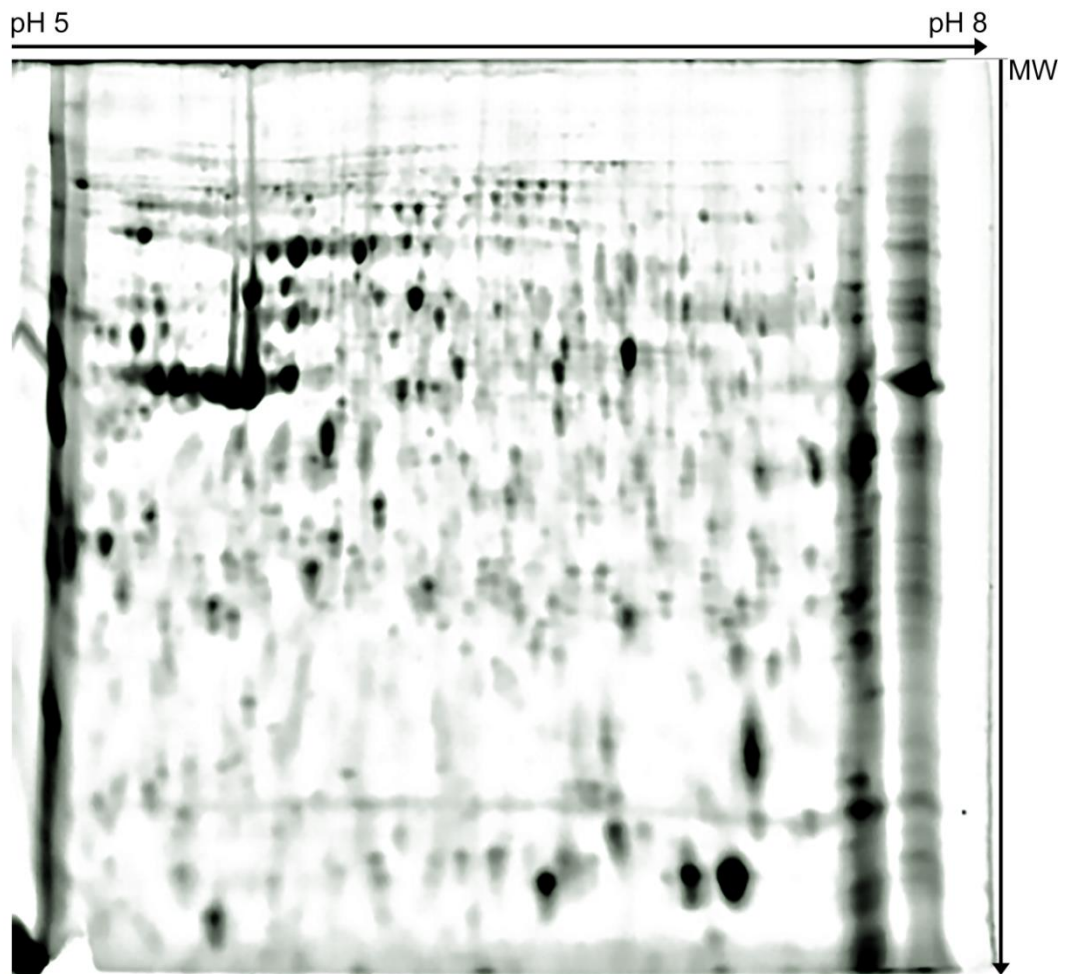
17. táblázat: Az egyes középbél szakaszok morfológiai eredményei. Az átlag \pm SEM értékeket jelenítettem meg

patkóbél	<i>ad libitum</i>	F24h	F24hRF2h
kripta mélység (mm)	0,15 \pm 0,006 ^a	0,16 \pm 0,005 ^a	0,18 \pm 0,005 ^b
<i>m. externa</i> (mm)	0,21 \pm 0,009 ^a	0,19 \pm 0,006 ^a	0,21 \pm 0,006 ^a
villus hossz (mm)	0,74 \pm 0,049 ^a	0,73 \pm 0,052 ^a	0,74 \pm 0,059 ^a
villus terület (mm ²)	0,13 \pm 0,013 ^a	0,11 \pm 0,015 ^a	0,16 \pm 0,019 ^a
éhbél			
kripta mélység (mm)	0,13 \pm 0,003 ^a	0,12 \pm 0,003 ^a	0,13 \pm 0,003 ^a
<i>m. externa</i> (mm)	0,14 \pm 0,006 ^a	0,15 \pm 0,005 ^a	0,13 \pm 0,004 ^a
villus hossz (mm)	1,00 \pm 0,077 ^a	0,74 \pm 0,051 ^b	0,87 \pm 0,081 ^c
villus terület (mm ²)	0,14 \pm 0,004 ^a	0,11 \pm 0,003 ^b	0,12 \pm 0,004 ^c
csípőbél			
kripta mélység (mm)	0,09 \pm 0,002 ^a	0,09 \pm 0,002 ^a	0,10 \pm 0,003 ^b
<i>m. externa</i> (mm)	0,15 \pm 0,004 ^a	0,15 \pm 0,004 ^a	0,16 \pm 0,006 ^a
villus hossz (mm)	0,66 \pm 0,097 ^a	0,58 \pm 0,032 ^a	0,63 \pm 0,018 ^a
villus terület (mm ²)	0,06 \pm 0,005 ^a	0,06 \pm 0,003 ^a	0,09 \pm 0,004 ^b

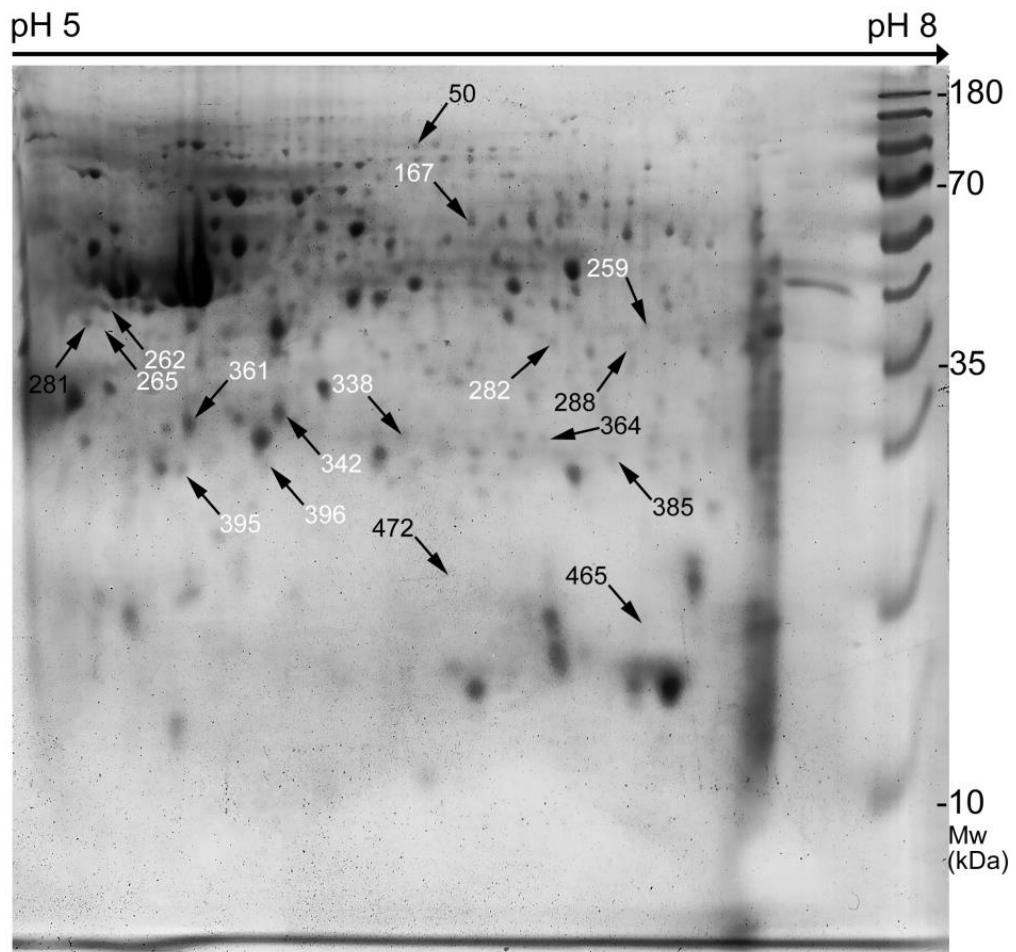
4.4.2 Az azonosított fehérjék

Kísérleteim során elvégeztem az *ad libitum* takarmányozott és a 24 óra takarmánymegvonásnak kitett csoportok összehasonlító proteomikai vizsgálatát. A szoftveres elemzés segítségével összesen 541 db foltot detektáltam a fúziós géliképen (19. ábra). Ezek közül 88 folt mutatott szignifikáns különbséget ($P < 0,05$) a két kísérleti csoport között. Küszöbértéknek 50%-os expressziós változást állítottam be, majd azzal a 17 db foltal dolgoztam tovább (18. táblázat), amelyek ennél nagyobb expressziós különbséget mutattak. Preparatív célból koloid Coomassie G-250 festéssel tettem láthatóvá egy mintakeveréket tartalmazó gél fehérje foltjait (20. ábra), amikből később kimetszettem a szignifikáns különbséget mutató foltokat, majd ezeket tömegspektrometriás azonosításra küldtem tovább. A tömegspektrometriás elemzés végül 11 fehérje foltot (21. ábra) azonosított sikeresen (19. táblázat). Az UniProt fehérje adatbázis szerint celluláris lokalizációjukat tekintve az azonosított fehérjék közül 4 az extracelluláris térbe szekretálódó (APOA1, APOA5, MUC6, EXFABP), 4 sejtváz

komponens (ACTA2, ACTB, KRT14, TPM1), 1 sejtmembrán fehérje (MAGT1), 1 citoplazmatikus fehérje (CHP1), 1 a sejtmagban található fehérje (HSP90AA1).



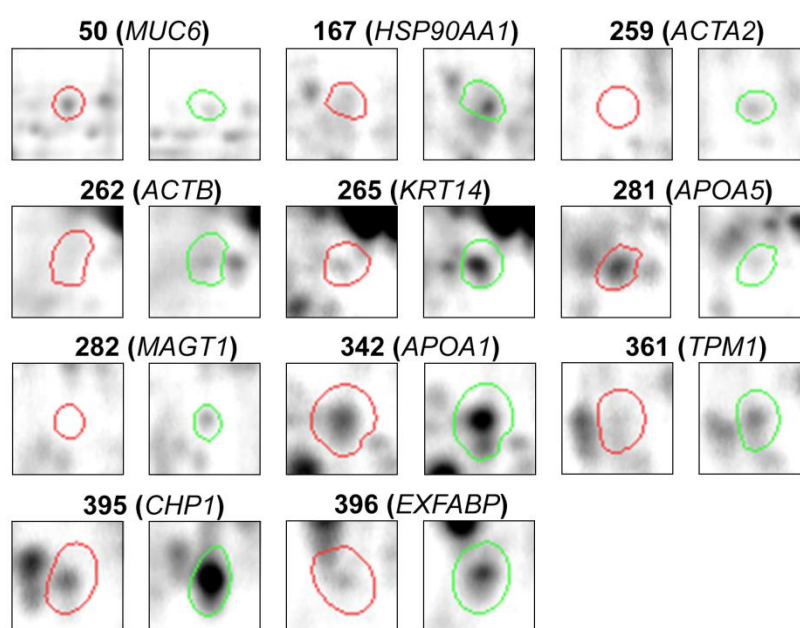
19. ábra: A kísérlet összes fehérje foltját tartalmazó, mesterséges ún. „fúziós” gél képe. A képet a különböző csatornákon beolvasott gélképek (összesen 24) kombinálásával hoztam létre a Delta2D szoftvert segítségével. A foltszámlálás 541 db egyedi fehérje foltot azonosított.



20. ábra: A házityúk éhbelének Coomassie-festett preparatív 2D PAGE gélképe. A 17 eltérően expresszálódó fehérje foltot nyilak jelölik. Az *ad libitum* csoporthoz képest csökkent kifejeződést fekete, a fokozott kifejeződést mutató foltokat fehér szám jelöli. Molekulamarkerként PageRuler előfestett fehérje létrát (180-10 kDa mérettartomány) használtam.

18. táblázat: A kísérleti csoportok között expressziós különbséget mutató fehérjefoltok intenzitás%-a, a belső sztenderdhez képest

folt azonosító	<i>ad libitum</i>		24 óra takarmánymegvonás	
	átlag	SEM	átlag	SEM
50	105,23	5,00	64,60	7,19
167	81,60	6,06	134,68	16,38
259	24,47	8,52	244,02	76,80
262	72,45	7,75	148,74	31,60
265	41,90	5,61	180,81	49,14
281	141,90	21,29	100,20	18,22
282	17,33	2,08	191,73	61,62
288	106,48	13,61	63,88	9,12
338	80,11	3,73	124,58	14,81
342	81,84	5,21	128,08	20,75
361	54,45	4,73	128,70	30,64
364	126,65	13,35	84,20	9,71
385	127,56	4,72	82,69	7,29
395	46,93	6,46	129,96	31,69
396	82,82	4,77	128,75	16,37
465	95,29	9,48	56,58	5,71
472	94,69	10,56	61,65	6,51



21. ábra: A két kísérleti csoport között expressziós különbséget mutató fehérjefoltok (az ábra szemléltetésre szolgál, egy-egy biológiai ismétléssel, a kísérletet csoportonként 8 egyeddel végeztük). Az *ad libitum* takarmányozott csoport foltjait vörös kör, a 24 órán át takarmánymegvont csoport foltjait zöld kör határolja.

19. táblázat: A tömegspekrométerrel azonosított fehérjék

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

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

A mucin-6

A mucinok nagy molekulatömegű, erősen glikozilált fehérjék. A gerincesek számos epitél szövete termeli, illetve madarak esetén ide tartoznak a tojásban is megtalálható ovomucinok. A gyomor-bélrendszerben a lumen mukózus rétegének kialakításában vesznek részt, ami védelmet nyújt az emésztőenzimek a makromolekulák és mikroorganizmusok ellen, valamint segíti a béltartalom mozgását. A házityúk genomában a *MUC4*, *MUC13*, *MUC16* (transzmembrán típusú mucinokat kódolják) és a *MUC2*, *MUC5AC*, *MUC5B*, *MUC6* (szekretálódó, gélképző típusok) gének meglétét azonosították idáig (Lang és mtsai., 2006). A japán fürj mirigy és zúzógyomor szöveti vizsgálatok a *MUC5AC* fehérje jelenlétét főleg a mirigysejteket burkoló sejtben mutatták ki, míg a *MUC1*, *MUC6* fehérjék jelenlétét a mélyebben fekvő fedősejtben (Liman és mtsai., 2010). Házityúk 72 órás éhezésekor a villus felület csökkenését és az éhbél mucin rétegének elvékonyodását tapasztalták (Smirnov és mtsai., 2004). A gélképző *MUC6* fehérje expressziójának 1,63 szoros csökkenése volt megfigyelhető a kísérletben, ami összefüggésbe hozható a mucinréteg éhezés hatására történő elvékonyodásával.

A magnézium transzporter fehérje 1

A magnézium transzporter fehérje 1, egyike a sejtmembrán Mg^{2+} csatornáinak, ami az intracelluláris magnéziumszint fenntartásában játszik szerepet. Madarak esetén jelenleg nem áll rendelkezésre információ a *MAGT1* funkciójára vonatkozóan. Az emlősök minden szövetében kifejeződik (Zhou és Clapham, 2009). Az egérvese, valamint a juhbendő epitél sejtek *MAGT1* expressziója külső extracelluláris magnézium koncentrációjának változására dinamikusan reagál (Goytain és Quamme, 2005). Expressziója feltételezhetően az éhezés hatására a béllumen csökkent magnézium koncentrációjának hatására nőtt meg, az intracelluláris normál magnéziumkoncentráció fenntartása érdekében.

Az extracelluláris zsírsavkötő fehérje

Ez az extracelluláris térbe kiválasztódó fehérje zsírsav- és bakteriális siderofórkötő tulajdonságait ismerték fel, aminek valószínűleg a házityúk immunrendszer *Escherichia coli*, illetve *Salmonella* fajok elleni védelemében is szerepe van (Correnti és mtsai., 2011; Rychlik és mtsai., 2014). Az EXFABP hiánya a csirke májsejtek

életképességének, valamint osztódási- és differenciálódási képességének drámai csökkenését és a természetes sejtelhalásuk fokozódását eredményezte. Az eredmények alapján az EXFABP-t egy olyan stresszfehérjének tartják, ami nélkülözhetetlen a sejtek számára olyan szövetekben, ahol aktív átalakulás zajlik, illetve a patológiás állapotok alatt a szövetkárosodás kijavításában (Di Marco és mtsai., 2003). Feltételezésem szerint az EXFABP expresszió növekedése az éhezés hatására történő szövetkárosodás megelőzése érdekében fokozódott 1,56-szeresére.

Keratin 14

A keratin 14 fehérje (K14) az intermedier filamentumok közé, az I-es típusú savas keratinok (citokeratinok) családba tartozik. Két molekula II-es típusú keratin 5-el heterotetramer formában alkotja az epitél sejtek citoszkeletonját. A házityúk genom háromszoros keratint kódoló génrepertoárral rendelkezik (tollazat, szarupikkely keratinok) az emlősökhöz képest (Hillier és mtsai., 2004; Schweizer és mtsai., 2006). Házityúk esetén a középbélben az egyes keratin változatok jelenlétét eddig nem vizsgálták. A keratin 14-et az aktinnal együtt japán nyúl (*Lepus brachyurus*) patkóbelének kripta és villus sejteiben azonosították. A K5/K18, K7/K17, és a K8/K14 filamentum párok a villus struktúra felépítésében a legjelentősebb molekulák (Iwatsuki és Suda, 2010, 2005).

A HSP90 alfa hőszokkfehérje

A molekulatömegük szerint rendszerezett hőszokk fehérjék egyik legfontosabb funkciója az, hogy a frissen szintetizált fehérjék konformációjának kialakulását elősegítsék. Szintjük gyakorlatilag mindenféle, a sejtet érő stresszhatás kapcsán megemelkedik (Szabó, 2009). A hőszokkfehérjéknek több mint 100 célpontja van, melyek a sejtciklust, és az apoptózist szabályozzák. A HSP90 minden eukarióta sejtben megtalálható, a sejt összes fehérje tartalmának 1-2, míg a stressz alatt álló sejtek 4-6%-át teheti ki (Zuehlke és mtsai., 2015). A HSP90 alfa hőszokkfehérje a HSP90 indukálható formája (míg a HSP90 béta állandóan kifejeződik). A házityúk *jejunum* és *ileum* HSP70 és HSP90 szintje megemelkedik hőstressz hatására (Varasteh és mtsai., 2015). A HSP27 és 90 fehérjék megnövekedett relatív szintjét mérték 36 órán át éheztetett sertés emésztő rendszer gyomor, középbél és vastagbél szakaszain (Lallès és Davis, 2011). A HSP90 alfa hőszokkfehérje fokozott, 1,65-szoros kifejeződést mutatott a kontroll csoporthoz

képest. Feltételezem, hogy ennek a takarmánymegvonás, az éhbél epitéliumra gyakorolt stresszhatás csökkentésében lehet szerepe.

A calcineurin homológ fehérje

A calcineurin homológ fehérje megtalálható a polarizált sejtek (amilyen a vékonybél epitélium is) exocitózist végző vezikuláiban. A calcineurin homológ fehérje kalciumion-kötésre képes. A sejttranszportban a vezikulák mikrotubulusok mentén történő mozgását teszi lehetővé a kinezin fehérjékkal kölcsönhatva. Ez a fehérje a sejtmembrán Na^+/H^+ ioncserélő fehérje működését is befolyásolja (Di Sole és mtsai., 2012; Matsushita és mtsai., 2007). Jelenleg még egyetlen publikáció sem foglalkozik azzal, hogy az éhezés milyen hatást gyakorol a calcineurin homológ fehérje kifejeződésére.

A citoplazma és simaizom-típusú aktin

Az α aktinok az izomrostokra specifikusak, a vékony filamentumok felépítői. A citoplazmatikus β - és γ -aktinok a legtöbb eukarióta sejtben kifejeződnek, és a sejtváz felépítésében vesznek részt. A simaizom-típusú α -aktin főleg az erekben, de háziyúk középbél simaizomrétegében is megtalálható fehérje. Az izmok kontraktilis rendszerének fő felépítője, aminek elsődleges feladata a vékonybélben a motilitás fenntartása (Dehkordi és mtsai., 2016). A béta aktin a kapcsolódó fehérjétől függően képes merev, viszonylag statikus struktúrákat kialakítani, mint a villusokat fedő mikrovillusok (Szabó, 2009). A mikrovillusokban a sejtmembránra párhuzamos aktin szálak találhatóak, amiket a villin és fimbrin fehérjék kötnek keresztbe, ezeket az aktin nyálábokat pedig a miozin-1 rögzíti a sejtmembránhoz (Fath és Burgess, 1995). A magzati fejlődésben visszamaradt sertés éhbelében megnövekedett a béta-aktin fehérje relatív szintje (Wang és mtsai., 2008).

A tropomiozin

A tropomiozin az aktin filamentumokhoz kötődik az izom és nem izom sejtekben. A simaizomsejtekben kontrakcióját a kaldezmonnal együtt szabályozza. A nem-izom sejtekben a citoszkeleton stabilitásában vesz részt, az aktin filamentumokhoz kötődve. Nem csak a háziyúk éhbelének simaizomrétegében, hanem a középbél villusok mukózus membránjában is megtalálható (Xie és mtsai., 1991).

A struktúrfehérjék takarmánymegvonás hatására mind fokozott expressziót mutattak (ACTA2, 9,97-szeres; ACTB, 2,05-szeres; KRT14, 4,32-szeres és a TPM1, 2,36-szeres a kontroll csoporthoz képest). Feltételezem, hogy expressziójuk növekedése a villusok újramodellezése érdekében nőhetett meg.

Az apolipoprotein A1 és A5

Az apolipoproteinek lipidkötő fehérjék, amik a nyirok és keringési rendszeren keresztül a lipidek szállításában vesznek részt. Az apolipoprotein A1 a vérplazmában található nagysűrűségű lipoprotein (HDL) fő fehérje összetevője, ami a szövetek felől szállítja a koleszterint a máj felé, ezt nevezzük reverz lipid transzportnak. Kalória restrikió hatására a máj *APOA1* expressziója csökkent brojlersírkék esetén (Richards és mtsai., 2003), nagyobb testzsírra szelektált vonalban szintén nagyobb kifejeződést mutatott (Lagarrigue és mtsai., 2000), ami a háziyúk esetén is jelzi a lipidhomeosztázisban betöltött szerepét. Egy napos éhezés hatására a háziyúk plazma HDL-ből visszanyerhető koleszterin aránya megnő (Peebles és mtsai., 2004). Az *APOA1* gén túlexpresszálása önmagában is fokozza a fordított lipid transzportot (Zhang és mtsai., 2003). Az *APOA1* fokozott (1,57-szeres) kifejeződése az éhezés hatására leírt fokozott reverz koleszterin transzportoz köthető.

Az apolipoprotein A5 kizárólag a májban és a középbélben fejeződik ki. Alacsony plazma koncentrációja arra enged következtetni, hogy inkább helyi katalitikus, mintsem strukturális funkcióval rendelkezik (Hubacek, 2016). Az *APOA5* fő funkciója a vérplazma triglicerid szintjének csökkentése. Ez a hatás lipoprotein lipáz *APOA5* általi aktiválásához köthető (Nilsson és mtsai., 2011). Éhezés hatására a háziyúk vérplazmájának triglicerid szintje, majdnem kétszeresére csökken (Peebles és mtsai., 2004). Az *APOA5* gén átírását a glükóz szint szabályozza, a glükózkoncentráció növelése *in vitro* tenyésztett májsejtek esetén fokozta az *APOA5* expressziót. A *in vitro*

középbél sejtekben zsírsav-koncentráció növekedésével, fokozódik az APOA5 kifejeződése (Guardiola és mtsai., 2012). Az emlősökkel szemben a madarak esetén nem csak a máj, hanem más perifériás szervek is részt vesznek a lipoproteinek szintézisében. Így az APOA5-nek a középbélben, feltételezhetően a lipid felszívásban és a lipoproteinek összeszerelésében és kiválasztásában van szerepe (Dichlberger és mtsai., 2007). Mivel éhezés hatására a plazma triglicerid szintje csökken, így érthető, hogy az APOA5 1,54-szeres expressziós csökkenése a triglicerid plazma szint további csökkenésének elkerülést szolgálhatja.

5. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

1. Első kísérletem a 40%-os takarmánykorlátozás hatását vizsgáltam a tojótípusú házityúk takarmányfelvételét szabályzó peptidjeinek és receptorainak kifejeződésére. Az eredményeimből arra következtetek, hogy a vizsgált neuropeptideket kódoló gének nem adnak visszajelzést a házityúk szervezetének takarmány ellátottságáról. Következtetésem szerint a PACAP és a galanin peptidek periférián megnövekedett expressziója a már megfigyelt takarmánykorlátozás béltraktus motilitás változáshoz köthető. Az eredményeim a PACAP tekintetében arra engednek következtetni, hogy az inkább helyi hatású peptid lehet, semmint a periférián felszabaduló és centrális hatással bíró peptid, mivel a plazma koncentrációja változatlan maradt a takarmánykorlátozás hatására, szemben más periférián termelődő peptidekkel. A takarmánykorlátozás nem befolyásolta a házityúk glükóz homeosztázisát.

2. A különböző táplálóanyag ellátottságok között is stabilan kifejeződő referenciagének kiválasztásakor a brojlercsirkék hipotalamuszában arra a következtetésre jutottam, hogy a *TBP* a legstabilabban expresszálódó referenciagén a tíz jelölt közül (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HMBS*, *LBR*, *POLR2B*, *RN18S*, *RPS17*, *TBP* és *YWHAZ*). Mivel a gén által kódolt fehérje elengedhetetlen az alap sejtfunkciók ellátására (általános transzkripciós faktor), az eredményeim alapján úgy tűnik, a gén expressziós szabályzása független a táplálóanyag ellátottságtól. A gén ezért az *ad libitum*-éhezés-újraetetés kísérletekben a qPCR adatok normalizációjához használható. Érdeemes lenne a *TBP* expresszióját további takarmánymegvonásos beállításban is megvizsgálni (például 48-72 h megvonás alatt) annak eldöntésére, hogy az univerzálisan használható-e függetlenül a takarmánymegvonás hosszától.

3. Megvizsgáltam, hogy a takarmánymegvonás-újraetetés és a növekedés milyen hatást gyakorol a brojlercsirke *MCH* gén kifejeződésére, valamint elvégeztem az *MCHR4* és *PMCH* gének kifejeződésének szövetek közti vizsgálatát. Következtetésem szerint a melanin koncentráció hormon részt vesz a házityúk takarmányfelvételének hosszabb távú szabályzásában, mivel annak koncentrációja megnőtt a hipotalamuszban takarmánymegvonás hatására és emelkedett maradt a két órás újraetetés követően is a kontroll csoporthoz képest. Mindkét gén mRNS szintje a központi idegrendszerben volt

magasabb a többi vizsgált szövettípushoz képest, ebből arra következtettek, hogy az MCH szerepe a periférián kevésbé jelentős. Mindkét gén mRNS szintje csökkenő trendet mutatott a növekedéssel, ebből arra következtettek, hogy valamilyen negatív szabályzás áll fenn a testtömeg és a két átirat hipotalamikus szintjei között, habár a korrelációelemzés nem mutatott szignifikáns összefüggést a házityúkból eddig leírt adipozitás szignálokkal. Az MCH koncentrációja 24 órás éhezést követően, majd az a 2 órás újraetetés követően is növekedett az *ad libitum* csoporthoz képest. Ennek magyarázata lehet, hogy az éhezés hatására bekövetkezett negatív energiamérleg a viszonylag rövid újraetést követően még nem állt helyre, ezt tükrözheti a fokozott MCH peptid (ami takarmányfelvételt fokozó, orexigén hatásáról ismert) koncentráció az étvágszabályzó központban. A fokozott MCH koncentráció arra enged következtetni, hogy a zsírraktárak állapotáról visszajelzést adó hormon jelenléte az emlősökhöz hasonlóan a házityúk keringésében is jelen van. Az emlősök esetén a leptin az energiaraktárak állapotáról, az energiamérlegről visszajelzést adó legfontosabb hormon, ám a házityúk leptin inkább helyi hatással bírhat, alacsony plazmakoncentrációt mutat, továbbá az nem változik a zsírraktárak állapotával. Házityúk esetén az inzulin és glükóz a feltételezhető adipozitás szignálok. Elvégeztem ezek plazma koncentrációjának korreláció elemzését a hipotalamikus MCH koncentrációval, ám köztük szoros korrelációt nem találtam. A fokozott MCH koncentráció mégis arra enged következtetni, hogy a zsírraktárak állapotáról visszajelzést adó hormon jelenléte az emlősökhöz hasonlóan a házityúk keringésében is jelen van. Érdeemes lenne a továbbiakban elvégezni a házityúk vérplazma összehasonlító peptidomikái vizsgálatát hasonló kísérleti beállítással. Ekkor azonosíthatóak lennének azok a peptidhormonok, amik eltérően expresszálódnak takarmánykorlátozás hatására. Ez kiindulópontja lehetne az olyan kutatásoknak, amikben újabb házityúk adipozitás szignálokat azonosíthatnánk.

4. Megvizsgáltam a takarmánymegvonás hatását a házityúk középbelének morfológiájára és az éhbelének a vizsgált tartományban expresszáló fehérjéire. Következtetésem szerint a 24 órás takarmánymegvonás hatására főként az extracelluláris térbe kiválasztódó és a struktúrfehérjék expressziója változott meg a brojlercsirke éhbelében. Biológiai funkciójukat tekintve ezek a sejtváz komponensei, a zsírsavkötésben és transzportban és az általános stresszválaszban, illetve az ion- és vezikula transzportban részt vevő fehérjék. A morfológiiai méréseim szerint az éhbél villus területeinek csökkenése volt megfigyelhető a 24 órás takarmánymegvonás

hatására, ami két órás újraetetés követően növekedésnek indult. Így feltételezhetjük, hogy az azonosított struktúrfehérjék kifejeződésének változása a villusok dinamikus változásához köthető, mivel az éhbél további morfometriai paramétereiben nem tapasztaltam változást. A középbél mucin rétegének elvékonyodásáról a szakirodalom már beszámolt. Eredményeim szerint a gélképző mucin 6 fehérje csökkent kifejeződése állhat ennek a jelenségnek a hátterében. A zsírsav anyagcserében résztvevő fehérjék megváltozott szintje valószínűleg a vérplazma csökkent glükóz szintjéhez és a fokozott reverz lipidtranszportozáshoz köthető.

5. A baromfi takarmányozása szempontjából az alábbi következtetéseket lehet levonni: Az *ad libitum*-tól eltérő táplálóanyag ellátottság befolyásolhatja az általam vizsgált néhány, a takarmányfelvétel szabályzásában részt vevő gén kifejeződését. Érdeemes lenne vizsgálatokat folytatni olyan bioaktív hatóanyagokkal, amik esetlegesen ezen orexigén peptidek receptorain fejtik ki a hatásukat. Használatuk a baromfi-takarmányozás hatékonyságát növelhetné. Érdeemes lenne további vizsgálatokat folytatni, arra vonatkozóan, hogy a vizsgált gének már azonosított alléljai (vagy a jövőben általunk újonnan azonosítottak) milyen kifejeződést mutatnak. A fokozottabb orexigén peptideket expressziáló állatok feltételezhetően fokozottabb takarmányfelvétellel párosulnának, ezek a génváltozatok a brojler típusú házityúk szelekciójára alkalmasak lehetnének.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Az értekezésben részletezett kísérletek eredményei alapján az alábbi új tudományos eredmények születtek:

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 inzulin receptor α alegységet a 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.

7. 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.

6. AZ EREDMÉNYEK GYAKORLATI HASZNOSÍTHATÓSÁGA

A kísérleteim során megállapított stabil referenciagén (*TBP*) hasznos lehet a házityúk további neuropeptidjeinek qPCR-es vizsgálatakor, mivel a 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.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az első kísérletemben célul tűztem ki a házityúk esetén még kevésbé kutatott, a takarmányfelvétel szabályozásában részt vevő néhány neuropeptidnek és receptorának expressziós vizsgálatát. A tojótípusú tyúkokat ($n=16$) két csoportba osztottam, a madarak fele ($n=8$) a napi takarmányadaguk 40%-os korlátozásában részesültek 5 napig, míg a kontroll csoportot *ad libitum* takarmányoztam. A következő célgének expresszióját kvantitáltam qPCR módszerrel: hipofízis adenilát cikláz aktiváló peptid (*PACAP*), és receptora (*PAC1*), galanin (*GAL*), neuromedin U (*NMU*), és két receptora (*NMUR1* és *NMUR2*), és a szénhidrát felvétel néhány elemét az inzulinreceptort (*INSR*, mRNS és fehérje kvantitálását is elvégeztem), továbbá a glükóztranszportereket (*GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*, *GLUT8*, *GLUT9*). A felsorolt gének expresszióját a hipotalamuszban, a mirigyes gyomorban és az éhbélben vizsgáltam. Továbbá RIA módszerrel kvantitáltam a PACAP-38 koncentrációit az említett szövetekben, illetve a vérplazmában is. Elsőként sikerült megállapítani a PACAP-38 átlagos koncentrációját a házityúk vérplazmában (22,03 fmol/ml), ami 13-szor alacsonyabb a kérődzőkben mért értékhez képest. A takarmánymegvonás 1,88-szoros növekedést mutatott génexpressziós és 1,27-szeres növekedést a PACAP peptid koncentrációkban a mirigyes gyomor esetén. A következő gének expressziója nőtt meg a hipotalamuszban: *PAC1* (1,49), *NMUR1* (1,63) *INSR* (1,36). A *GLUT3* (0,36) és a *GLUT9* (0,49-szeres) csökkenését mértem, állandó vérplazma glükóz és inzulin koncentrációk mellett. Az éhbélminták esetén növekedést mértem a *PACAP* (2,76-szeres) az *NMU* (3,41) az *NMUR1* (3,01) a *GAL* (3,08) és az *INSR* (1,96) esetén. Az *INSR α* relatív fehérje szintjében 1,96-szoros különbséget találtam a takarmánykorlátozott csoport középbél mintái esetén. A szöveti metszetek immunfestése és a jelerősség pontozásának segítségével megállapítottam, hogy az éhbél epitéliuma és kriptái, valamint a mirigyes gyomor epitéliuma expresszál több *INSR α* -t a kontroll csoporthoz képest. A *PACAP* kifejeződése az éhbél és mirigyes gyomorban fokozódott, míg a hipotalamuszban és a plazmában nem mutatott változást. Feltételezem, hogy a PACAP fokozott kifejeződése a gasztrointesztinális rendszer (GIT) mentén a takarmánykorlátozás motilitás változásra kifejtett hatásának tudható be, mivel annak plazma szintje nem változott és a szakirodalom már beszámolt annak simaizom kontrakciót moduláló hatásáról.

Megvizsgáltam, milyen trendeket követ a szakirodalom a referenciagének kiválasztását és használatát tekintve a házityúk qPCR-al végzett génexpressziós kísérletekben általában és a takarmánymegvonás hatására. Primereket terveztem 10 referenciagén-jelöltre (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HMBS*, *LBR*, *POLR2B*, *RN18S*, *RPS17*, *TBP* és *YWHAZ*), majd mintavételt követően megvizsgáltam ezek stabilitását a brojlercsirke hipotalamuszában, 5 különböző, erre a célra kidolgozott statisztikai módszerrel. A kísérlet beállítását három csoporttal végeztem ($n=8$ /csoport) melyek az *ad libitum* takarmányozott, 24 órára takarmánymegvont, valamint 24 órára takarmánymegvont, majd 2 órára újraetetett csoportok voltak. A referenciagén-jelölteket stabilitási értékeik alapján rangsoroltam. A *TBP*, aminek génterméke egy olyan transzkripció faktor, ami az eukarióta sejtek alap sejtélettani folyamatában az mRNS szintézisben vesz részt, nem befolyásolja a takarmányozottsági állapot, a tíz referenciagén-jelölt közül a legstabilabb kifejeződést mutatta. Mind a három kísérleti beállításban és az összevont körülmények között is stabil kifejeződést mutatott, ezért a hasonló jellegű kísérletekben megbízható referenciagénként használható majd a takarmányfelvételt szabályzó neuropeptidek kifejeződésének vizsgálatokor. A szakirodalomban gyakran használt (az esetek 36,4, 33,9 és 7,4%-a), *ACTB*, *GAPDH* és *RN18S* referenciagének stabilitásukat tekintve a *TBP* mögött maradtak.

A harmadik kísérletem célja az volt, hogy kvantitáljam az emlősök esetén már leírt, orexigén hatású melanin koncentráció hormont (*PMCH*) és receptorát (*MCHR4*) kódoló gén hipotalamikus kifejeződését qPCR módszerrel, az előző bekezdésben részletezett kísérleti beállítás mellett. Meghatároztam az érett MCH peptid koncentrációját egy, a közelmúltban közölt RIA módszerrel. A különböző takarmányellátottság mellett a két gén növekedési változását is vizsgáltam 7, 14, 28 és 35 napos életkorokban. A *PMCH* és *MCHR4* kifejeződését a GIT mentén megvizsgáltam. A takarmányellátottság nem befolyásolta sem a *PMCH* sem az *MCHR4* mRNS expresszióját. 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, míg a vérplazma inzulin koncentrációi csökkenést mutattak. A korrelációelemzés alapján az MCH peptid koncentrációja és a hasüregi zsír mennyisége nem korrelál egymással, sem az olyan adipozitás szignállokkal, 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, ez is jelezi a központi idegrendszerben betöltött konzervált funkciójukat. A *PMCH* gén végterméke az MCH peptid koncentrációja fokozódott a 24 órás éhezés hatására, majd az azt követő 2 órás újraetetés hatására tovább növekedett. Úgy gondolom, hogy ez a megfigyelés az MCH-nak a brojlercsirkében is, a takarmányfelvétel szabályzásában betöltött szerepét jelzi, az emlősökhöz hasonlóan. Mindkét gén kifejeződése csökkenő trendet mutatott a növekedés előrehaladtával. A liposztát elmélet szerint az orexigén peptidek kifejeződésére negatív hatással van a zsírraktárak növekedése. Ennek ellenére, korrelációt nem találtam az MCH agyi koncentráció, az élősúly és a hasüregi zsír összefüggésében.

Következő kísérletemben arra kerestem a választ, hogy a középbél bélbolyhainak a szakirodalomban leírt és az általam is megfigyelt takarmányellátottságtól függő morfológiai változásával párhuzamosan milyen proteomikai változások zajlanak. Az éhbél esetén 22%-os csökkentést mértem a villusok területében 24 óra éhezést követően, ami a kontroll értékénél 15%-al kisebbre tért vissza a 2 órás újraetetés után. A további mért paraméterben, mint a kripták mélysége, vagy a *musculus externa* vastagságában nem találtam változást. Szoftveres elemzés segítségével megállapítottam, hogy az éhbélmintákban pH 5-8 tartományban 541 fehérje folt található. A foltok denzitometrálnálása és statisztikai összehasonlítása alapján megállapítottam, hogy 17 fehérjefolt (spot) 1,5-szeres vagy nagyobb expressziós különbséget mutatott 24 óra éhezést követően. Végül 11 folt azonosítása történt meg sikeresen. A kontroll csoporthoz képest 9 fehérje fokozott kifejeződést mutatott, ezek rendre az aktin (citoplazma-típusú), aktin (simaizom-típusú), apolipoprotein A1, extracelluláris zsírsavkötő fehérje, hősokkfehérje 90 kDa alfa A osztály 1, kalcineurin B homológ fehérje 1, keratin (citoszkeletális 14-es típus), magnézium transzporter fehérje 1 és a tropomiozin alfa-1 voltak. Két fehérje, az apolipoprotein A5 és a mucin-6 csökkent kifejeződést mutatott. Következtetésem szerint a 24 órás takarmánymegvonás hatására főként, az extracelluláris térbe kiválasztódó és a struktúrfehérjék expressziója változott meg a brojlercsirke éhbelében. Biológiai funkciójukat tekintve ezek a sejtvezetési komponensek, a zsírsavkötésben és transzportban és az általános stresszválaszban, illetve az ion- és vezikula transzportban részt vevő fehérjék. Az éhbél villusok

takarmányellátottságtól függő dinamikus átalakulását részben magyarázhatják az általam leírt fehérje expressziós változások.

8. SUMMARY

In the first experiment, the expression of some less studied neuropeptides and their receptors involved in feed intake regulation of chickens was investigated. Layer type hens ($n=16$) were divided into two groups, half of the animals ($n=8$) were subjected to 40% feed restriction for 5 days whereas the other group was fed *ad libitum*. The expression of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (*PACAP*), its receptor (*PAC1*), galanin (*GAL*), neuromedin U (*NMU*), and its two receptors (*NMUR1* and *NMUR2*) was quantified with qPCR, and component of carbohydrate uptake and regulation. These are namely insulin receptor (with qPCR and western blot too), and some glucose transporters involved in glucose transport (*GLUT1*, *GLUT2*, *GLUT3*, *GLUT8*, *GLUT9*, *INSR*) in the hypothalamus, proventriculus, and jejunum. With radioimmunoassay it became possible to quantify the PACAP-38 concentrations in the aforementioned tissues and plasma as well. The PACAP concentration in chicken plasma was measured for the very first time by RIA. It was 13-fold lower compared to ruminants. Feed restriction resulted in a 1.88 fold increase in mRNA and a 27% increase in peptide level of PACAP in proventriculus measured with qPCR and RIA, respectively. Increase was found in the gene expression of *PAC1* (1.49), *NMUR1* (1.63) *INSR* (1.36) and lower expression for *GLUT3* (0.36), *GLUT9* (0.49) in the hypothalamus, however plasma glucose and insulin concentrations did not change. Higher expressions of peptide encoding genes (2.76 fold for *PACAP*, 3.41 for *NMU*, 3.01 fold for *NMUR1* and 3.08 fold for *GAL*) and *INSR* (1.96) were recorded in the jejunum of hens exposed to restricted nutrition. A 1.96 fold difference was detected at protein level of *INSR α in the feed restricted group's jejunum samples. The anatomical regions which respond differently to feed restriction by altering their insulin receptor expression were found. These are the epithelium and crypts of villi and the epithelium of proventriculus. The results indicate that PACAP concentration responds to calorie restriction in the proventriculus and jejunum, but not in the hypothalamus and plasma. Increased expression along the GIT might be due to differences in the gastrointestinal tract motility in feed restricted compared to *ad libitum* fed chickens.*

A comprehensive study of reference genes in chicken related experiments was performed. The current trends of reference gene selection and usage regarding chicken

qPCR studies in general and in relation to fasting were investigated. The expressional stability of 10 reference gene candidates (*ACTB*, *B2M*, *GAPDH*, *HMBS*, *LBR*, *POLR2B*, *RN18S*, *RPS17*, *TBP*, and *YWHAZ*) in chicken hypothalamus was tested by five different, but already established methods. Experimental conditions were *ad libitum* fed, fasted for 24 h and fasted for 24 h then refed for 2 h and under pooled conditions (with $n=8$ birds in each group). Candidate reference genes were ranked according to their stability values. *TBP* got the best rank under all experimental conditions and our study recommends it as reference gene to be used for normalization for qPCR in chicken hypothalamus, because its expressional stability remains unaffected by feeding state. Despite their common appearance in gene expression studies (36.4, 33.9 and 7.4% overall), *ACTB*, *GAPDH* and *RN18S* are not the best choice for accurate normalization of qPCR results as their stability rank lagged behind *TPB*.

The third experiment was aimed to quantify the gene expression changes of the potent orexigenic melanin concentrating hormone (MCH) in chicken with qPCR and for the first time determine peptide concentrations with a recently developed RIA method under different feeding status and in relation with growth. Broiler type chickens ($n=24$) were assigned into three different experimental groups namely *ad libitum* fed, fasting for 24 h, fasting for 24 h then refed for 2 h were applied to study the changes of the aforementioned target and its receptor (*MCHR4*) gene expression to different nutritional states. The relative changes of *MCH* and *MCHR4* were also studied from 7 to 35 days of age. Expression of *PMCH* and *MCHR4* along the gastrointestinal tract (GIT) was also investigated. It was found that both targets expression are restricted to the hypothalamus, only weak expression was detected along the GIT. Different nutritional states did not affect the *PMCH* nor *MCHR4* mRNA levels. However, fasting for 24h significantly increased MCH-like immunoreactivity with 25.65%. Fasting for 24h then refed for 2 h further significantly increased MCH peptide concentration by 32.51% compared to *ad libitum* state. Decreasing trend was observable both for *PMCH* and *MCHR4* mRNA levels and also for MCH-like immunoreactivity while plasma insulin concentration increased with age. Correlation analysis did not result significant correlation between MCH peptide concentration and abdominal fat mass, plasma glucose or with insulin levels in *ad libitum* fed birds. It was found that *MCHR4* and *PMCH* expressions are mainly restricted to the hypothalamus in broiler chickens. Gene expression of the selected transcripts are independent of feeding status, but MCH-like

immunoreactivity was increased with fasting followed by refeeding which indicates a role in feed intake regulation of broiler chickens. Both gene's transcript and MCH-like immunoreactivity had showed decreasing trend in the hypothalamus with age which rises further questions why these gene's expression alter during ontogenesis. In conclusion, MCH peptide concentration altered with different feeding states in the hypothalamus, which indicates that this peptide takes part in feed intake regulation (short-term signalization of feed intake) of broiler chickens in a same manner as in mammals.

Finally the jejunal proteome changes of 24 h fasted broiler chickens compared to the *ad libitum* fed ones from the previous experiment was investigated by 2D-DIGE. Morphometric analysis of the duodenum, jejunum and ileum tissue sections resulted that a significant 22 percent decrease in villi area caused by 24 h fasting which returned to a 15% lower level after 2 h refeeding compared to *ad libitum* fed group. Other morphometric parameters like depth of crypts and width of *musculus externa* remained unchanged in the investigated GIT samples. After two-dimensional gel electrophoresis, 541 different spots were detected in the jejunum with Delta2D software. Statistical analysis of spot densities showed that 17 spots were significantly changed as the result of 24 h fasting. These spots were cut out from gel and sent to mass spectrometry for identification. 11 spots were successfully identified. Higher expression were found in 9 of them in the fasted group namely actin, cytoplasmic type 1; actin, smooth muscle type; apolipoprotein A1; calcineurin B homologous protein 1; extracellular fatty acid-binding protein; heat shock protein 90 kDa alpha class A member 1; keratin, type I cytoskeletal 14; magnesium transporter protein 1 and tropomyosin alpha-1 chain, while 2 of them showed lower expression: apolipoprotein A5 and mucin-6. Functional and biological characterization of the identified proteins revealed that most of them are part of the cytoskeleton or a secreted protein and are involved in general stress response, ion- and vesicle transport. It can be concluded that the dynamic remodeling of jejunal villi in GIT caused by feeding state can be partially explained by the identified protein alterations.

All together it was found that the 24 h long fasting mainly affects the level of structural and secreted proteins in the jejunum of broiler chicken. According to their biological functions these proteins are cytoskeletal components, involved in fatty acid binding and transport, general stress response and ion- or vesicle transport. Our

morphometric measurements revealed that the 24 h long fasting significantly decreased the villus area and height. So it can be concluded that the identified protein alterations can be related to the decrease of villi morphometry. All the identified cytoskeletal structure proteins (ACTA2; ACTB; KRT14; TPM1) showed increased expression. It seems that these proteins are the most important ones in villus remodelling caused by fasting.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Andersen, C. L. – Jensen, J. L. – Orntoft, T. F.: 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*. 64. 15: 5245–5250.
2. 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.
3. Andres, S. F. – Santoro, M. A. – Mah, A. T. – Keku, J. A. – Bortvedt, A. E. – Blue, R. E. – Lund, P. K.: 2015. Deletion of intestinal epithelial insulin receptor attenuates high-fat diet-induced elevations in cholesterol and stem, enteroendocrine, and Paneth cell mRNAs. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 308. 2: G100–11.
4. Aoki, K. – Kondo, M. – Okuda, M. – Saneyasu, T. – Honda, K. – Kamisoyama, H.: 2017. Identification, expression analysis, and functional characterization of peptide YY in chickens (*Gallus gallus domesticus*). *General and Comparative Endocrinology*. 242. 11–17.
5. Aranda, P. S. – LaJoie, D. M. – Jorcyk, C. L.: 2012. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*. 33. 2: 366–369.
6. Austin, C. – Lo, G. – Nandha, K. A. – Meleagros, L. – Bloom, S. R.: 1995. Cloning and characterization of the cDNA encoding the human neuromedin U (NMU) precursor: NMU expression in the human gastrointestinal tract. *Journal of Molecular Endocrinology*. 14. 2: 157–169.
7. Bagés, S. – Estany, J. – Tor, M. – Pena, R.: 2015. Investigating reference genes for quantitative real-time PCR analysis across four chicken tissues. *Gene*. 561. 1: 82–87.
8. Baile, C. A. – Della-Fera, M. A. – Martin, R. J.: 2000. Regulation of metabolism and body fat mass by leptin. *Annual Review of Nutrition*. 20. 1: 105–127.
9. Bálint, E. – Mezey, S. – Csillag, A.: 2011. Efferent connections of nucleus accumbens subdivisions of the domestic chicken (*Gallus domesticus*): an anterograde pathway tracing study. *Journal of Comparative Neurology*. 519. 15: 2922–2953.

10. Begriche, K. – Levasseur, P. R. – Zhang, J. – Rossi, J. – Skorupa, D. – Solt, L. A. – Young, B. – Burris, T. P. – Marks, D. L. – Mynatt, R. L. – Butler, A. A.: 2011. Genetic Dissection of the Functions of the Melanocortin-3 Receptor, a Seven-transmembrane G-protein-coupled Receptor, Suggests Roles for Central and Peripheral Receptors in Energy Homeostasis. *Journal of Biological Chemistry*. 286. 47: 40771–40781.
11. 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.
12. 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.
13. Bisbis, S. – Derouet, M. – Simon, J.: 1994. Characterization of Insulin Receptors in Chicken Kidneys: Effect of Nutritional Status. *General and Comparative Endocrinology*. 96. 1: 37–49.
14. 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.
15. Borowska, D. – Rothwell, L. – Bailey, R. – Watson, K. – Kaiser, P.: 2016. Identification of stable reference genes for quantitative PCR in cells derived from chicken lymphoid organs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 170. 20–24.
16. Börzsei, R. – Márk, L. – Tamás, A. – Bagoly, T. – Bay, C. – Csanáky, K. – Bánki, E. – Kiss, P. – Váczy, A. – Horváth, G. – Németh, J. – Szauer, E. – Helyes, Z. – Reglődi, D.: 2009. Presence of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide-38 in human plasma and milk. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*. 160. 4: 561–565.
17. Boswell, T. – Dunn, I. C.: 2017. Regulation of Agouti-Related Protein and Pro-Opiomelanocortin Gene Expression in the Avian Arcuate Nucleus. *Frontiers in Endocrinology*. 8.
18. Boswell, T.: 2005. Regulation of energy balance in birds by the neuroendocrine hypothalamus. *The Journal of Poultry Science*. 42. 3: 161–181.

19. Bradley, R. L. – Kokkotou, E. G. – Maratos–Flier, E. – Cheatham, B.: 2000. Melanin–concentrating hormone regulates leptin synthesis and secretion in rat adipocytes. *Diabetes*. 49. 7: 1073.
20. Breton, C. – Schorpp, M. – Nahon, J.: 1993. Isolation and characterization of the human melanin–concentrating hormone gene and a variant gene. *Molecular Brain Research*. 18. 4: 297–310.
21. Bustin, S. A. – Benes, V. – Garson, J. A. – Hellemans, J. – Huggett, J. – Kubista, M. – Mueller, R. – Nolan, T. – Pfaffl, M. W. – Shipley, G. L. – Vandesompele, J. – Wittwer, C. T.: 2009. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real–time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55. 4: 611–622.
22. Cai, G. – Mo, C. – Huang, L. – Li, J. – Wang, Y.: 2015. Characterization of the Two CART Genes (*CART1* and *CART2*) in Chickens (*Gallus gallus*). *PloS One*. 10. 5: e0127107.
23. Campbell, B. – Dimaline, R. – Dockray, G. – Hughes, J.: 1991. Inhibition of food intake by omeprazole in the chicken. *European Journal of Pharmacology*. 209. 3: 231–235.
24. 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.
25. Clench, M. – Mathias, J.: 1995. Motility Responses to Fasting in the Gastrointestinal–Tract of 3 Avian Species. *Condor*. 97. 4: 1041–1047.
26. Correnti, C. – Clifton, M. C. – Abergel, R. J. – Allred, B. – Hoette, T. M. – Ruiz, M. – Cancedda, R. – Raymond, K. N. – Descalzi, F. – Strong, R. K.: 2011. Galline Ex–FABP is an antibacterial siderocalin and a lysophosphatidic acid sensor functioning through dual ligand specificities. *Structure*. 19. 12: 1796–1806.
27. Coudert, E. – Pascal, G. – Dupont, J. – Simon, J. – Cailleau–Audouin, E. – Crochet, S. – Duclos, M. J. – Tesseraud, S. – Métayer–Coustard, S.: 2015. Phylogenesis and biological characterization of a new glucose transporter in the chicken (*Gallus gallus*), GLUT12. *PloS One*. 10. 10: e0139517.
28. Covasa, M. – Forbes, J.: 1994. Exogenous Cholecystokinin–Octapeptide in Broiler–Chickens – Satiety, Conditioned Color Aversion, and Vagal Mediation. *Physiology & Behavior*. 56. 1: 39–49.
29. Cui, L. – Lv, C. – Zhang, J. – Mo, C. – Lin, D. – Li, J. – Wang, Y.: 2017. Characterization of melanin–concentrating hormone (MCH) and its receptor in

- chickens: Tissue expression, functional analysis, and fasting-induced up-regulation of hypothalamic MCH expression. *Gene*. 615. 57–67.
30. Czeglédi, L. – Stündl, L. – Posta, J.: 2013. Baromfitenyésztés, a termék-előállítás biológiai alapjai. Debreceni Egyetem. Debrecen.
 31. 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.
 32. De Boever, S. – Vangestel, C. – De Backer, P. – Croubels, S. – Sys, S.: 2008. Identification and validation of housekeeping genes as internal control for gene expression in an intravenous LPS inflammation model in chickens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 122. 3: 312–317.
 33. 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.
 34. Dehkordi, R. A. F. – Baghai, R. – Rahimi, R.: 2016. Morphometric properties and distribution of alpha-actin in the smooth muscle cells (ASMA) of the small intestine during development in chicken. *Journal of Applied Animal Research*. 44. 1: 492–497.
 35. 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.
 36. Denbow, D. – Cherry, J. – Vankrey, H. – Siegel, P.: 1982. The Effects of Intraventricular-Injections of Glucose on Food and Water-Intake of Chickens. *Poultry Science*. 61. 7: 1377–1377.
 37. Denbow, D. – Snapir, N. – Furuse, M.: 1999. Inhibition of food intake by CRF in chickens. *Physiology & Behavior*. 66. 4: 645–649.
 38. Denbow, D. M. – Meade, S. – Robertson, A. – McMurtry, J. P. – Richards, M. – Ashwell, C.: 2000. Leptin-induced decrease in food intake in chickens. *Physiology & Behavior*. 69. 3: 359–362.
 39. Denbow, D. M.: 1994. Peripheral regulation of food intake in poultry. *The Journal of Nutrition*. 124. 8 Suppl: 1349S–1354S.

40. Di Marco, E. – Sessarego, N. – Zerega, B. – Cancedda, R. – Descalzi Cancedda, F.: 2003. Inhibition of cell proliferation and induction of apoptosis by *ExFABP* gene targeting. *Journal of Cellular Physiology*. 196. 3: 464–473.
41. Di Sole, F. – Vadnagara, K. – Moe, O. W. – Babich, V.: 2012. Calcineurin homologous protein: a multifunctional Ca²⁺-binding protein family. *American Journal of Physiology. Renal Physiology*. 303. 2: F165–79.
42. Dichlberger, A. – Cogburn, L. A. – Nimpf, J. – Schneider, W. J.: 2007. Avian apolipoprotein A–V binds to LDL receptor gene family members. *Journal of Lipid Research*. 48. 7: 1451–1456.
43. Ding, B. – Lenzi, C. – Pirone, A.: 2014. Immunohistochemical Study on Glucagon–Like Peptide–1 (GLP–1) and Pituitary Adenylate Cyclase Activating Peptide (PACAP) in the Small Intestine of Muscovy Duck during the Prehatching and Posthatching Periods. *The Journal of Poultry Science*. 51. 1: 35–41.
44. Dogrukol–Ak, D. – Tore, F. – Tuncel, N.: 2004. Passage of VIP/PACAP/secretin family across the blood–brain barrier: therapeutic effects. *Current Pharmaceutical Design*. 10. 12: 1325–1340.
45. Doherty, M. K. – McLean, L. – Hayter, J. R. – Pratt, J. M. – Robertson, D. H. – El-Shafei, A. – Gaskell, S. J. – Beynon, R. J.: 2004. The proteome of chicken skeletal muscle: changes in soluble protein expression during growth in a layer strain. *Proteomics*. 4. 7: 2082–2093.
46. Domin, J. – Benito–Orfila, M. A. – Nandha, K. A. – Aitken, A. – Bloom, S. R.: 1992. The purification and sequence analysis of an avian neuromedin U. *Regulatory Peptides*. 41. 1: 1–8.
47. Duchêne, S. – Audouin, E. – Crochet, S. – Duclos, M. J. – Dupont, J. – Tesseraud, S.: 2008. Involvement of the ERK1/2 MAPK pathway in insulin–induced S6K1 activation in avian cells. *Domestic Animal Endocrinology*. 34. 1: 63–73.
48. Dunn, I. – Wilson, P. – Smulders, T. – Sandilands, V. – D'Eath, R. – Boswell, T.: 2013. Hypothalamic Agouti-Related Protein Expression Is Affected by Both Acute and Chronic Experience of Food Restriction and Re-Feeding in Chickens. *Journal of Neuroendocrinology*. 25. 10: 920–928.
49. Dupont, J. – Derouet, M. – Simon, J. – Taouis, M.: 1998. Nutritional state regulates insulin receptor and IRS–1 phosphorylation and expression in chicken. *The American Journal of Physiology*. 274. 2 Pt 1: E309–16.

50. Dupont, J. – Tesseraud, S. – Simon, J.: 2009. Insulin signaling in chicken liver and muscle. *General and Comparative Endocrinology*. 163. 1–2: 52–57.
51. Dyballa, N. – Metzger, S.: 2009. Fast and sensitive colloidal coomassie G–250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*. (30). pii: 1431. doi. 30: 10.3791/1431.
52. Fan, W. – Wang, H. – Zhang, Y. – Zhang, A. – Fan, W. – Wang, H. – Zhang, Y. – Zhang, A.: 2012. Evaluation of the suitability of five housekeeping genes as internal control for quantitative real–time RT–PCR assays in chickens acutely infected with IBV M41 strain. *Journal of Animal and Veterinary Advances*. 11. 17: 3064–3067.
53. Fang, X. – Zhu, X. – Chen, S. – Zhang, Z. – Zeng, Q. – Deng, L. – Peng, J. – Yu, J. – Wang, L. – Wang, S. – Gao, P. – Jiang, Q. – Shu, G.: 2014. Differential gene expression pattern in hypothalamus of chickens during fasting–induced metabolic reprogramming: Functions of glucose and lipid metabolism in the feed intake of chickens. *Poultry Science*. 93. 11: 2841–2854.
54. Fath, K. R. – Burgess, D. R.: 1995. Microvillus assembly: not actin alone. *Current Biology*. 5. 6: 591–593.
55. Fischer, A. H. – Jacobson, K. A. – Rose, J. – Zeller, R.: 2008. Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protocols*. 2008. pdb.prot4986.
56. Fleige, S. – Pfaffl, M. W.: 2006. RNA integrity and the effect on the real–time qRT–PCR performance. *Molecular Aspects of Medicine*. 27. 2: 126–139.
57. Franssens, L. – Lesuisse, J. – Wang, Y. – Willems, E. – Willemsen, H. – Koppenol, A. – Guo, X. – Buyse, J. – Decuyper, E. – Everaert, N.: 2016. The effect of insulin on plasma glucose concentrations, expression of hepatic glucose transporters and key gluconeogenic enzymes during the perinatal period in broiler chickens. *General and Comparative Endocrinology*. 232. 67–75.
58. Friedman–Einat, M. – Boswell, T. – Horev, G. – Girishvarma, G. – Dunn, I. – Talbot, R. – Sharp, P.: 1999. The chicken leptin gene: has it been cloned? *General and Comparative Endocrinology*. 115. 3: 354–363.
59. Furuse, M. – Dockray, G.: 1995. The regulation of gastrin secretion in the chicken. *Regulatory Peptides*. 55. 3: 253–259.
60. Furuse, M. – Matsumoto, M. – Mori, R. – Sugahara, K. – Kano, K. – Hasegawa, S.: 1997. Influence of fasting and neuropeptide Y on the suppressive food intake

- induced by intracerebroventricular injection of glucagon-like peptide-1 in the neonatal chick. *Brain Research*. 764. 1–2: 289–292.
61. Geelissen, S. – Swennen, Q. – Van der Geyten, S. – Kuhn, E. – Kaiya, H. – Kangawa, K. – Decuypere, E. – Buyse, J. – Darras, V.: 2006. Peripheral ghrelin reduces food intake and respiratory quotient in chicken. *Domestic Animal Endocrinology*. 30. 2: 108–116.
 62. Gerets, H. – Peeters, K. – Arckens, L. – Vandesaende, F. – Berghman, L.: 2000. Sequence and distribution of pro-opiomelanocortin in the pituitary and the brain of the chicken (*Gallus gallus*). *Journal of Comparative Neurology*. 417. 2: 250–262.
 63. Geyra, A. – Uni, Z. – Sklan, D.: 2001. The effect of fasting at different ages on growth and tissue dynamics in the small intestine of the young chick. *British Journal of Nutrition*. 86. 1: 53–61.
 64. Girault, E. M. – Yi, C. – Fliers, E. – Kalsbeek, A.: 2012. Orexins, feeding, and energy balance. *Orexin/hypocretin System*. 198. 47–64.
 65. Gonzales, E. – Kondo, N. – Saldanha, E. – Loddy, M. – Careghi, C. – Decuypere, E.: 2003. Performance and physiological parameters of broiler chickens subjected to fasting on the neonatal period. *Poultry Science*. 82. 8: 1250–1256.
 66. Goytain, A. – Quamme, G. A.: 2005. Identification and characterization of a novel mammalian Mg²⁺ transporter with channel-like properties. *BMC Genomics*. 6. 1: 48.
 67. Griffin, C. – Flouriot, G. – Sharp, P. – Greene, G. – Gannon, F.: 2001. Distribution analysis of the two chicken estrogen receptor- α isoforms and their transcripts in the hypothalamus and anterior pituitary gland. *Biology of Reproduction*. 65. 4: 1156–1163.
 68. Guardiola, M. – Alvaro, A. – Vallve, J. – Rosales, R. – Sola, R. – Girona, J. – Serra, N. – Duran, P. – Esteve, E. – Masana, L.: 2012. APOA5 gene expression in the human intestinal tissue and its response to *in vitro* exposure to fatty acid and fibrates. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*. 22. 9: 756–762.
 69. Gulyás, G. – Csósz, E. – Prokisch, J. – Jávora, A. – Mézes, M. – Erdélyi, M. – Balogh, K. – Janáky, T. – Szabó, Z. – Simon, Á. – L. Czeglédi.: 2017. Effect of nano-sized, elemental selenium supplement on the proteome of chicken liver. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 101. 3: 502–510.

70. Hagen, C. J. – Newmyer, B. A. – Webster, R. I. – Gilbert, E. R. – Siegel, P. B. – Tachibana, T. – Cline, M. A.: 2013. Stimulation of food intake after central galanin is associated with arcuate nucleus activation and does not differ between genetically selected low and high body weight lines of chickens. *Neuropeptides*. 47. 4: 281–285.
71. Havel, P. J. – Kasim–Karakas, S. – Mueller, W. – Johnson, P. R. – Gingerich, R. L. – Stern, J. S.: 1996. Relationship of plasma leptin to plasma insulin and adiposity in normal weight and overweight women: effects of dietary fat content and sustained weight loss. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 81. 12: 4406–4413.
72. Helgeson, S. C. – Schmutz, S. M.: 2008. Genetic variation in the pro–melanin–concentrating hormone gene affects carcass traits in *Bos taurus* cattle. *Animal Genetics*. 39. 3: 310–315.
73. Helyes, Z. – Pozsgai, G. – Börzsei, R. – Németh, J. – Bagoly, T. – Márk, L. – Pintér, E. – Tóth, G. – Elekes, K. – Szolcsányi, J.: 2007. Inhibitory effect of PACAP–38 on acute neurogenic and non–neurogenic inflammatory processes in the rat. *Peptides*. 28. 9: 1847–1855.
74. Hetherington, A. W. – Ranson, S. W.: 1940. Hypothalamic lesions and adiposity in the rat. *The Anatomical Record*. 78. 2: 149–172.
75. Higuchi, R. – Dollinger, G. – Walsh, P. S. – Griffith, R.: 1992. Simultaneous Amplification and Detection of Specific DNA–Sequences. *Bio–Technology*. 10. 4: 413–417.
76. Hillier, L. W. – Miller, W. – Birney, E. – Warren, W. – Hardison, R. C. – Ponting, C. P. – Bork, P. – Burt, D. W. – Groenen, M. A. – Delany, M. E.: 2004. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*. 432. 7018: 695–716.
77. Hiramatsu, K. – Yamasaki, A.: 2009. Immunohistochemical study on the innervation of the chicken pancreas by pituitary adenylate cyclase–activating polypeptides (PACAPs)–containing nerves. *The Journal of Poultry Science*. 46. 3: 234–239.
78. Honda, K. – Saneyasu, T. – Hasegawa, S. – Kamisoyama, H.: 2012. A comparative study of the central effects of melanocortin peptides on food intake in broiler and layer chicks. *Peptides*. 37. 1: 13–17.

79. Honda, K. – Saneyasu, T. – Kamisoyama, H.: 2017. Gut Hormones and Regulation of Food Intake in Birds. *The Journal of Poultry Science*. 54. 2: 103–110.
80. Honda, K. – Saneyasu, T. – Okuda, M. – Uemura, T. – Kamisoyama, H.: 2015. Glucagon and Neuromedin U Suppress Food Intake in Broiler Chicks. *Journal of Poultry Science*. 52. 4: 268–273.
81. Howard, A. D. – Wang, R. P. – Pong, S. S.: 2000. Identification of receptors for neuromedin U and its role in feeding. *Nature*. 406. 6791: 70–74.
82. Hubacek, J. A.: 2016. Apolipoprotein A5 fifteen years anniversary: Lessons from genetic epidemiology. *Gene*. 592. 1: 193–199.
83. Hube, F. – Lietz, U. – Igel, M. – Jensen, P. – Tornqvist, H. – Joost, H. – Hauner, H.: 1996. Difference in leptin mRNA levels between omental and subcutaneous abdominal adipose tissue from obese humans. *Hormone and Metabolic Research*. 28. 12: 690–693.
84. Huggett, J. – Dheda, K. – Bustin, S. – Zumla, A.: 2005. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*. 6. 4: 279–284.
85. Husband, S. A. – Shimizu, T.: 2011. Calcium-binding protein distributions and fiber connections of the nucleus accumbens in the pigeon (*Columba livia*). *Journal of Comparative Neurology*. 519. 7: 1371–1394.
86. Iwatsuki, H. – Suda, M.: 2005. Maturation of three kinds of keratin networks in the absorptive cells of rabbit duodenum. *Acta Histochemica Et Cytochemica*. 38. 3: 237–245.
87. Iwatsuki, H. – Suda, M.: 2010. Seven kinds of intermediate filament networks in the cytoplasm of polarized cells: structure and function. *Acta Histochemica Et Cytochemica*. 43. 2: 19–31.
88. 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.
89. James, P.: 1997. Protein identification in the post-genome era: the rapid rise of proteomics. *Quarterly Reviews of Biophysics*. 30. 4: 279–331.
90. Józsa, R. – Mess, B.: 1993. Galanin-like immunoreactivity in the chicken brain. *Cell and Tissue Research*. 273. 2: 391–399.

91. 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.
92. Józsa, R. – Somogyvári–Vigh, A. – Reglődi, D. – Hollósy, T. – Arimura, A.: 2001. Distribution and daily variations of PACAP in the chicken brain. *Peptides*. 22. 9: 1371–1377.
93. Juhász, T. – Helgadottir, S. L. – Tamás, A. – Reglődi, D. – Zákany, R.: 2015. PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides*. 66. 51–57.
94. Kaiya, H. – Saito, E. – Tachibana, T. – Furuse, M. – Kangawa, K.: 2007. Changes in ghrelin levels of plasma and proventriculus and ghrelin mRNA of proventriculus in fasted and refed layer chicks. *Domestic Animal Endocrinology*. 32. 4: 247–259.
95. Kameda, Y. – Miura, M. – Nishimaki, T.: 2001. Localization of neuropeptide Y mRNA and peptide in the chicken hypothalamus and their alterations after food deprivation, dehydration, and castration. *Journal of Comparative Neurology*. 436. 3: 376–388.
96. Kamisoyama, H. – Honda, K. – Saneyasu, T. – Sugahara, K. – Hasegawa, S.: 2007. Central administration of neuromedin U suppresses food intake in chicks. *Neuroscience Letters*. 420. 1: 1–5.
97. Katayama, S. – Hamasu, K. – Shigemi, K. – Cline, M. A. – Furuse, M.: 2010. Intracerebroventricular injection of orexin–A, but not orexin–B, induces arousal of layer-type neonatal chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*. 157. 2: 132–135.
98. Kato, H. – Okubo, Y. – Matsumura, Y. – Roberts, J., Charles T. – Sugahara, K. – Leroith, D.: 2000. The Tyrosine Kinase Activity of the Chicken Insulin Receptor Is Similar to That of the Human Insulin Receptor. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 64. 4: 903–906.
99. Kawakami, S. – Bungo, T. – Ando, R. – Ohgushi, A. – Shimojo, M. – Masuda, Y. – Furuse, M.: 2000. Central administration of alpha-melanocyte stimulating hormone inhibits fasting- and neuropeptide Y-induced feeding in neonatal chicks. *European Journal of Pharmacology*. 398. 3: 361–364.

100. Kawauchi, H. – Kawazoe, I. – Tsubokawa, M. – Kishida, M. – Baker, B. I.: 1983. Characterization of melanin-concentrating hormone in chum salmon pituitaries. *Nature*. 305. 5932: 321–323.
101. Khan, S. – Roberts, J. – Wu, S.: 2017. Reference gene selection for gene expression study in shell gland and spleen of laying hens challenged with infectious bronchitis virus. *Scientific Reports*. 7. 14271.
102. Kiss, P. – Reglődi, D. – Tamás, A. – Lubics, A. – Lengvári, I. – Józsa, R. – Somogyvári-Vigh, A. – Szilvássy, Z. – Németh, J.: 2007. Changes of PACAP levels in the brain show gender differences following short-term water and food deprivation. *General and Comparative Endocrinology*. 152. 2–3: 225–230.
103. Klein, S. – Jurkevich, A. – Grossmann, R.: 2006. Sexually dimorphic immunoreactivity of galanin and colocalization with arginine vasotocin in the chicken brain (*Gallus gallus domesticus*). *Journal of Comparative Neurology*. 499. 5: 828–839.
104. Kozera, B. – Rapacz, M.: 2013. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*. 54. 4: 391–406.
105. Kubista, M.: 2007. The Prime Technique Real-time PCR Data Analysis. *Git Laboratory Journal Europe*. 11. 9/10: 33.
106. Kuchipudi, S. V. – Tellabati, M. – Nelli, R. K. – White, G. A. – Perez, B. B. – Sebastian, S. – Slomka, M. J. – Brookes, S. M. – Brown, I. H. – Dunham, S. P.: 2012. 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells. *Virology Journal*. 9. 1: 1.
107. Kumano, S. – Matsumoto, H. – Takatsu, Y. – Noguchi, J. – Kitada, C. – Ohtaki, T.: 2003. Changes in hypothalamic expression levels of galanin-like peptide in rat and mouse models support that it is a leptin-target peptide. *Endocrinology*. 144. 6: 2634–2643.
108. Lagarrigue, S. – Daval, S. – Bordas, A. – Douaire, M.: 2000. Hepatic lipogenesis gene expression in two experimental egg-laying lines divergently selected on residual food consumption. *Genetics Selection Evolution*. 32. 2: 205.
109. Lallès, J. – David, J.: 2011. Fasting and refeeding modulate the expression of stress proteins along the gastrointestinal tract of weaned pigs. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 95. 4: 478–488.
110. Lam, S. – Liu, Y. – Liong, E. – Tipoe, G. – Fung, M. L.: 2012. Upregulation of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and its receptor expression in

- the rat carotid body in chronic and intermittent hypoxia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. 758. 301–306.
111. Lang, T. – Hansson, G. C. – Samuelsson, T.: 2006. An inventory of mucin genes in the chicken genome shows that the mucin domain of Muc13 is encoded by multiple exons and that ovomucin is part of a locus of related gel-forming mucins. *Bmc Genomics*. 7. 197.
112. Le, T. T. – Lehnert, S. – Colgrave, M. L.: 2014. Neuropeptidomics applied to studies of mammalian reproduction. *Peptidomics*. 1. 1:
113. Leeson, S. – Caston, L. – Summers, J. – Lee, K.: 1999. Performance of male broilers to 70 days when fed diets of varying nutrient density as mash or pellets. *Journal of Applied Poultry Research*. 8. 4: 452–464.
114. Leeson, S. – Caston, L. – Summers, J.: 1996. Broiler response to diet energy. *Poultry Science*. 75. 4: 529–535.
115. Leeson, S. – Summers, J. D.: 2009. Commercial poultry nutrition. feeding programs for laying hens. Nottingham University Press, Nottingham, England.
116. 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.
117. Lewis, P. D. – Danisman, R. – Gous, R. M.: 2009. Photoperiodic responses of broilers. I. Growth, feeding behaviour, breast meat yield, and testicular growth. *British Poultry Science*. 50. 6: 657–666.
118. Li, W. – Xue, F. – Li, L. – Li, X. – Yue, B. – Li, J.: 2012. A triple-primer PCR approach for the sex identification of endangered Phasianidae birds. *European Journal of Wildlife Research*. 58. 1: 289–294.
119. Liman, N. – Alan, E. – Küçük Bayram, G.: 2010. The differences between the localizations of MUC1, MUC5AC, MUC6 and osteopontin in quail proventriculus and gizzard may be a reflection of functional differences of stomach parts. *Journal of Anatomy*. 217. 1: 57–66.
120. Liu, X. – Dunn, I. – Sharp, P. – Boswell, T.: 2007. Molecular cloning and tissue distribution of a short form chicken leptin receptor mRNA. *Domestic Animal Endocrinology*. 32. 3: 155–166.

121. Luts, A. – Uddman, R. – Sundler, F.: 1989. Neuronal galanin is widely distributed in the chicken respiratory tract and coexists with multiple neuropeptides. *Cell and Tissue Research*. 256. 1: 95–103.
122. Macabelli, C. H. – Ferreira, R. M. – Gimenes, L. U. – de Carvalho, Nelcio Antonio Tonizza – Soares, J. G. – Ayres, H. – Ferraz, M. L. – Watanabe, Y. F. – Watanabe, O. Y. – Sangalli, J. R.: 2014. Reference gene selection for gene expression analysis of oocytes collected from dairy cattle and buffaloes during winter and summer. *PloS One*. 9. 3: e93287.
123. Magdeldin, S. – Enany, S. – Yoshida, Y. – Xu, B. – Zhang, Y. – Zureena, Z. – Lokamani, I. – Yaoita, E. – Yamamoto, T.: 2014. Basics and recent advances of two dimensional–polyacrylamide gel electrophoresis. *Clinical Proteomics*. 11. 1: 16.
124. Malagó, W., Jr – Franco, H. M. – Matheucci, E., Jr – Medaglia, A. – Henrique–Silva, F.: 2002. Large scale sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. *BMC Biotechnology*. 2. 19.
125. Matsuda, K. – Maruyama, K. – Nakamachi, T. – Miura, T. – Shioda, S.: 2006. Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and Vasoactive Intestinal Polypeptide on Food Intake and Locomotor Activity in the Goldfish, *Carassius auratus*. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1070. 1: 417–421.
126. Matsushita, M. – Sano, Y. – Yokoyama, S. – Takai, T. – Inoue, H. – Mitsui, K. – Todo, K. – Ohmori, H. – Kanazawa, H.: 2007. Loss of calcineurin homologous protein–1 in chicken B lymphoma DT40 cells destabilizes Na⁺/H⁺ exchanger isoform–1 protein. *American Journal of Physiology. Cell Physiology*. 293. 1: C246–54.
127. Mbajiorgu, C. A. – Ng'ambi, J. – Norris, D.: 2011. Voluntary feed intake and nutrient composition in chickens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 6. 1: 20–28.
128. McCarthy, D. J. – Smyth, G. K.: 2009. Testing significance relative to a fold–change threshold is a TREAT. *Bioinformatics*. 25. 6: 765–771.
129. Mirabella, N. – Esposito, V. – Squillacioti, C. – De Luca, A. – Paino, G.: 2004. Expression of agouti–related protein (AgRP) in the hypothalamus and adrenal gland of the duck (*Anas platyrhynchos*). *Anatomy and Embryology*. 209. 2: 137–141.

130. Miranda, B. – Esposito, V. – de Girolamo, P. – Sharp, P. J. – Wilson, P. W. – Dunn, I. C.: 2013. Orexin in the chicken hypothalamus: immunocytochemical localisation and comparison of mRNA concentrations during the day and night, and after chronic food restriction. *Brain Research*. 1513. 34–40.
131. Miyata, A. – Arimura, A. – Dahl, R. R. – Minamino, N. – Uehara, A. – Jiang, L. – Culler, M. D. – Coy, D. H.: 1989. Isolation of a novel 38 residue–hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 164. 1: 567–574.
132. 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.
133. Mounien, L. – Do Rego, J. – Bizet, P. – Boutelet, I. – Gourcerol, G. – Fournier, A. – Brabet, P. – Costentin, J. – Vaudry, H. – Jegou, S.: 2009. Pituitary Adenylate Cyclase–Activating Polypeptide Inhibits Food Intake in Mice Through Activation of the Hypothalamic Melanocortin System. *Neuropsychopharmacology*. 34. 2: 424–435.
134. Nahon, J.: 2006. Chapter 98 – The Melanin–Concentrating Hormone. 705–714. [In: Kastin, A.J. Handbook of Biologically Active Peptides. Second Edition.] Elsevier. USA.
135. Nascimento, C. S. – Barbosa, L. T. – Brito, C. – Fernandes, R. P. – Mann, R. S. – Pinto, A. P. G. – Oliveira, H. C. – Dodson, M. V. – Guimarães, S. E. – Duarte, M. S.: 2015. Identification of Suitable Reference Genes for Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays on Pectoralis major Muscle in Chicken (*Gallus gallus*). *PloS One*. 10. 5: e0127935.
136. Naufahu, J. – Alzaid, F. – Brito, M. F. – Doslikova, B. – Valencia, T. – Cunliff, A. – Murray, J. F.: 2017. Melanin–concentrating hormone in peripheral circulation in the human. *Journal of Endocrinology*. 232. 3: 513–523.
137. Nilsson, S. K. – Heeren, J. – Olivecrona, G. – Merkel, M.: 2011. Apolipoprotein AV; a potent triglyceride reducer. *Atherosclerosis*. 219. 1: 15–21.
138. Nolan, T. – Hands, R. E. – Bustin, S. A.: 2006. Quantification of mRNA using real–time RT–PCR. *Nature Protocols*. 1. 3: 1559–1582.
139. Okimura, K. – Sakura, N. – Kurosawa, K. – Hashimoto, T.: 1992. Contractile activity of porcine neuromedin U–25 and various neuromedin U–related peptide

- fragments on isolated chicken crop smooth muscle. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 40. 6: 1500–1503.
140. Olias, P. – Adam, I. – Meyer, A. – Scharff, C. – Gruber, A. D.: 2014. Reference genes for quantitative gene expression studies in multiple avian species. *PLoS One*. 9. 6: e99678.
141. 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.
142. Palkovits, M.: 2003. Hypothalamic regulation of food intake. *Ideggyógyászati Szemle*. 56. 9–10: 288–302.
143. 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.
144. Peeters, K. – Gerets, H. H. – Arckens, L. – Vandesaende, F.: 2000. Distribution of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide type I receptor mRNA in the chicken brain. *Journal of Comparative Neurology*. 423. 1: 66–82.
145. Perez–Montarelo, D. – Madsen, O. – Alves, E. – Rodriguez, M. C. – Folch, J. M. – Noguera, J. L. – Groenen, M. A. – Fernandez, A. I.: 2014. Identification of genes regulating growth and fatness traits in pig through hypothalamic transcriptome analysis. *Physiological Genomics*. 46. 6: 195–206.
146. Pfaffl, M. W. – Tichopad, A. – Prgomet, C. – Neuvians, T. P.: 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel–based tool using pair–wise correlations. *Biotechnology Letters*. 26. 6: 509–515.
147. Pfaffl, M. W.: 2001. A new mathematical model for relative quantification in real–time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*. 29. 9: e45.
148. Phillips–Singh, D. – Li, Q. – Takeuchi, S. – Ohkubo, T. – Sharp, P. – Boswell, T.: 2003. Fasting differentially regulates expression of agouti–related peptide, pro–opiomelanocortin, prepro–orexin, and vasoactive intestinal polypeptide mRNAs in the hypothalamus of Japanese quail. *Cell and Tissue Research*. 313. 2: 217–225.
149. Pirone, A. – Baoan, D. – Piano, I. – Della Santina, L. – Baglini, A. – Lenzi, C.: 2011. Pituitary adenylate cyclase–activating peptide (PACAP)

- immunoreactivity distribution in the small intestine of the adult New Hampshire chicken. *Acta Histochemica*. 113. 4: 477–483.
150. Presse, F. – Nahon, J.L. Chapter 110. MCH. In: Abba, J. K.: 2013. Handbook of Biologically Active Peptides. Academic Press. San Diego. USA.
151. Rácz, B. – Horváth, G. – Reglődi, D. – Gasz, B. – Kiss, P. – Gallyas, F. – Sümegi, B. – Tóth, G. – Németh, A. – Lubics, A.: 2010. PACAP ameliorates oxidative stress in the chicken inner ear: an *in vitro* study. *Regulatory Peptides*. 160. 1: 91–98.
152. Radcliff, R. – Lookingland, K. – Chapin, L. – Tucker, H.: 2001. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces secretion of growth hormone in cattle. *Domestic Animal Endocrinology*. 21. 3: 187–196.
153. Radonić, A. – Thulke, S. – Mackay, I. M. – Landt, O. – Siegert, W. – Nitsche, A.: 2004. Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 313. 4: 856–862.
154. Reid, A. M. A. – Dunn, I. C.: 2018. Gastrointestinal distribution of chicken gastrin-cholecystokinin family transcript expression and response to short-term nutritive state. *General and Comparative Endocrinology*. 255. 64–70.
155. Richards, M. – Poch, S. – McMurtry, J.: 2005. Expression of the proglucagon and companion receptor genes in chickens. *Poultry Science*. 84. 55–56.
156. Richards, M. – Poch, S. – McMurtry, J.: 2006. Characterization of turkey and chicken ghrelin genes, and regulation of ghrelin and ghrelin receptor mRNA levels in broiler chickens. *General and Comparative Endocrinology*. 145. 3: 298–310.
157. Richards, M. P. – Poch, S. M. – Coon, C. N. – Rosebrough, R. W. – Ashwell, C. M. – McMurtry, J. P.: 2003. Feed restriction significantly alters lipogenic gene expression in broiler breeder chickens. *The Journal of Nutrition*. 133. 3: 707–715.
158. Richards, M. P. – Proszkowiec-Weglarz, M.: 2007. Mechanisms regulating feed intake, energy expenditure, and body weight in poultry. *Poultry Science*. 86. 7: 1478–1490.
159. Rodríguez-Sinovas, A. – Fernandez, E. – Manteca, X. – Fernandez, A. G. – Gonalons, E.: 1997. CCK is involved in both peripheral and central mechanisms controlling food intake in chickens. *The American Journal of Physiology*. 272. 1 Pt 2: R334–40.
160. RuiJie, H. – LinSen, Z. – HongBao, W. – XiaoBai, Z. – LinSheng, G. – XianLin, Z.: 2010. Effect of G3909A mutation in pituitary adenylate cyclase-activating

- polypeptide gene (PACAP) on the partial growth traits in Qinchuan cattle. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 18. 4: 719–724.
161. Ruijter, J. – van der Velden, S. – Ilgun, A.: 2009. LinRegPCR: Analysis of quantitative RT–PCR data [computer program]. Version 11.0. *Amsterdam, the Netherlands: Heart Failure Research Center, Academic Medical Centre*.
162. Rychlik, I. – Elsheimer–Matulova, M. – Kyrova, K.: 2014. Gene expression in the chicken caecum in response to infections with non–typhoid *Salmonella*. *Veterinary Research*. 45. 1: 119.
163. Sahraei, M.: 2012. Feed restriction in broiler chicken production: a review. *Global Veterinarian*. 8. 5: 449–458.
164. Sainte–Marie, G.: 1962. A paraffin embedding technique for studies employing immunofluorescence. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 10. 3: 250–256.
165. Saito, Y. – Nothacker, H. – Wang, Z. – Lin, S. H.: 1999. Molecular characterization of the melanin–concentrating–hormone receptor. *Nature*. 400. 6741: 265.
166. 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.
167. Saneyasu, T. – Honda, K. – Kamisoyama, H. – Ikura, A. – Nakayama, Y. – Hasegawa, S.: 2011. Neuropeptide Y effect on food intake in broiler and layer chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 159. 4: 422–426.
168. Saneyasu, T. – Nakanishi, K. – Atsuta, H. – Ikura, A. – Kamisoyama, H. – Hasegawa, S. – Honda, K.: 2013. Age–dependent changes in the mRNA levels of neuropeptide Y, proopiomelanocortin, and corticotropin–releasing factor in the hypothalamus in growing broiler chicks. *The Journal of Poultry Science*. 50. 4: 364–369.
169. Santoro, M. A. – Blue, R. E. – Andres, S. F. – Mah, A. T. – Van Landeghem, L. – Lund, P. K.: 2015. Obesity and intestinal epithelial deletion of the insulin receptor, but not the IGF 1 receptor, affect radiation–induced apoptosis in colon. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*. 309. 7: G578–89.
170. Scanes, C. G.: 2014. *Sturkie's avian physiology*. Academic Press. London. England.

171. Schwartz, M. W. – Woods, S. C. – Porte, D. – Seeley, R. J. – Baskin, D. G.: 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature*. 404. 6778: 661–671.
172. Schweizer, J. – Bowden, P. E. – Coulombe, P. A. – Langbein, L. – Lane, E. B. – Magin, T. M. – Maltais, L. – Omary, M. B. – Parry, D. A. – Rogers, M. A. – Wright, M. W.: 2006. New consensus nomenclature for mammalian keratins. *The Journal of Cell Biology*. 174. 2: 169–174.
173. Seroussi, E. – Cinnamon, Y. – Yosefi, S. – Genin, O. – Smith, J. G. – Rafati, N. – Bornelöv, S. – Andersson, L. – Friedman–Einat, M.: 2015. Identification of the long-sought leptin in chicken and duck: expression pattern of the highly GC-rich avian leptin fits an autocrine/paracrine rather than endocrine function. *Endocrinology*. 157. 2: 737–751.
174. 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.
175. Shimada, M. – Tritos, N. A. – Lowell, B. B. – Flier, J. S. – Maratos–Flier, E.: 1998. Mice lacking melanin-concentrating hormone are hypophagic and lean. *Nature*. 396. 6712: 670–674.
176. Shioda, S. – Ohtaki, H. – Nakamachi, T. – Dohi, K. – Watanabe, J. – Nakajo, S. – Arata, S. – Kitamura, S. – Okuda, H. – Takenoya, F.: 2006. Pleiotropic functions of PACAP in the CNS. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1070. 1: 550–560.
177. Shiraishi, J. – Tanizawa, H. – Fujita, M. – Kawakami, S. – Bungo, T.: 2011a. Localization of hypothalamic insulin receptor in neonatal chicks: Evidence for insulinergic system control of feeding behavior. *Neuroscience Letters*. 491. 3: 177–180.
178. Shiraishi, J. – Yanagita, K. – Fukumori, R. – Sugino, T. – Fujita, M. – Kawakami, S. – McMurtry, J. P. – Bungo, T.: 2011b. Comparisons of insulin related parameters in commercial-type chicks: Evidence for insulin resistance in broiler chicks. *Physiology & Behavior*. 103. 2: 233–239.
179. Shiraishi, J. – Yanagita, K. – Nishikawa, F. – Tahara, Y. – Fujita, M. – McMurtry, J. P. – Bungo, T.: 2009. A comparison of the anorexic effects of chicken, porcine, human and bovine insulin on the central nervous system of chicks. *Journal of Poultry Science*. 46. 2: 144–148.

180. Silver, N. – Best, S. – Jiang, J. – Thein, S. L.: 2006. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*. 7. 1: 1.
181. Simon, J. – Rideau, N. – Taouis, M. – Dupont, J.: 2011. Plasma insulin levels are rather similar in chicken and rat. *General and Comparative Endocrinology*. 171. 3: 267–268.
182. Simon, J. – Rideau, N. – Taouis, M. – Sharp, P. – Dunn, I. – Waddington, D. – Boswell, T.: 2008. Chicken leptin: general and comparative endocrinology. *General and Comparative Endocrinology*. 158: 2–4.
183. Simon, J. – Rosebrough, R. W. – McMurtry, J. P. – Steele, N. C. – Roth, J. – Adamo, M. – LeRoith, D.: 1986. Fasting and refeeding alter the insulin receptor tyrosine kinase in chicken liver but fail to affect brain insulin receptors. *The Journal of Biological Chemistry*. 261. 36: 17081–17088.
184. Singh, O. – Kumar, S. – Singh, U. – Kumar, V. – Lechan, R. M. – Singru, P. S.: 2016. Cocaine-and amphetamine-regulated transcript peptide (CART) in the brain of zebra finch, *Taeniopygia guttata*: Organization, interaction with neuropeptide Y, and response to changes in energy status. *Journal of Comparative Neurology*. 524. 15: 3014–3041.
185. Sintubin, P. – Greene, E. – Collin, A. – Bordas, A. – Zerjal, T. – Tesseraud, S. – Buyse, J. – Dridi, S.: 2014. Expression profile of hypothalamic neuropeptides in chicken lines selected for high or low residual feed intake. *Neuropeptides*. 48. 4: 213–220.
186. Sirotkin, A. V. – Pavlova, S. – Tena-Sempere, M. – Grossmann, R. – Jiménez, M. R. – Rodriguez, J. M. C. – Valenzuela, F.: 2013. Food restriction, ghrelin, its antagonist and obestatin control expression of ghrelin and its receptor in chicken hypothalamus and ovary. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*. 164. 1: 141–153.
187. 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.
188. Song, Z. – Liu, L. – Yue, Y. – Jiao, H. – Lin, H. – Sheikhhahmadi, A. – Everaert, N. – Decuyper, 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.

189. Sun, G. – Li, M. – Li, H. – Tian, Y. – Chen, Q. – Bai, Y. – Kang, X.: 2013. Molecular cloning and SNP association analysis of chicken *PMCH* gene. *Molecular Biology Reports*. 40. 8: 5049–5055.
190. Szabó G.: 2009. Sejtbiológia. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest.
191. 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.
192. Tachibana, T. – Saito, S. – Tomonaga, S. – Takagi, T. – Saito, E. – Boswell, T. – Furuse, M.: 2003. Intracerebroventricular injection of vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibits feeding in chicks. *Neuroscience Letters*. 339. 3: 203–206
193. Tachibana, T. – Sugahara, K. – Ohgushi, A. – Ando, R. – Kawakami, S. – Yoshimatsu, T. – Furuse, M.: 2001. Intracerebroventricular injection of agouti-related protein attenuates the anorexigenic effect of alpha-melanocyte stimulating hormone in neonatal chicks. *Neuroscience Letters*. 305. 2: 131–134.
194. Tachibana, T. – Sugimoto, I. – Ogino, M. – Khan, M. S. I. – Masuda, K. – Ukena, K. – Wang, Y.: 2015. Central administration of chicken growth hormone-releasing hormone decreases food intake in chicks. *Physiology & Behavior*. 139. 195–201.
195. Takeuchi, S. – Teshigawara, K. – Takahashi, S.: 2000. Widespread expression of Agouti-related protein (AGRP) in the chicken: a possible involvement of AGRP in regulating peripheral melanocortin systems in the chicken. *Biochimica Et Biophysica Acta–Molecular Cell Research*. 1496. 2–3: 261–269.
196. Taouis, M. – Chen, J. – Daviaud, C. – Dupont, J. – Derouet, M. – Simon, J.: 1998. Cloning the chicken leptin gene. *Gene*. 208. 2: 239–242.
197. Tatamoto, K. – Rokaesus, A. – Jornvall, H. – Mcdonald, T. J. – Mutt, V.: 1983. Galanin – a Novel Biologically-Active Peptide from Porcine Intestine. *FEBS Letters*. 164. 1: 124–128.
198. Taverniers, I. – Van Bockstaele, E. – De Loose, M.: 2003. Fingerprinting and quantification of GMOs in the agro-food sector. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*. 68. 2 Pt B: 395–399.
199. Tokushima, Y. – Sulistiyanto, B. – Takahashi, K. – Akiba, Y.: 2003. Insulin-glucose interactions characterised in newly hatched broiler chicks. *British Poultry Science*. 44. 5: 746–751.

200. Tokushima, Y. – Takahashi, K. – Sato, K. – Akiba, Y.: 2005. Glucose uptake *in vivo* in skeletal muscles of insulin-injected chicks. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*. 141. 1: 43–48.
201. Tong, H. B. – Lu, J. – Zou, J. M. – Wang, Q. – Shi, S. R.: 2012. Effects of stocking density on growth performance, carcass yield, and immune status of a local chicken breed. *Poultry Science*. 91. 3: 667–673.
202. Tora, L.: 2002. A unified nomenclature for TATA box binding protein (TBP)–associated factors (TAFs) involved in RNA polymerase II transcription. *Genes & Development*. 16. 6: 673–675.
203. Unger, J. W. – Livingston, J. N. – Moss, A. M.: 1991. Insulin receptors in the central nervous system: Localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Progress in Neurobiology*. 36. 5: 343–362.
204. Ünlü, M. – Morgan, M. E. – Minden, J. S.: 1997. Difference gel electrophoresis. A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis*. 18. 11: 2071–2077.
205. Van Dorpe, S. – Bronselaer, A. – Nielandt, J. – Stalmans, S. – Wynendaele, E. – Audenaert, K. – Van De Wiele, C. – Burvenich, C. – Peremans, K. – Hsuchou, H.: 2012. Brainpeps: the blood–brain barrier peptide database. *Brain Structure and Function*. 217. 3: 687–718.
206. Vandesompele, J. – De Preter, K. – Pattyn, F. – Poppe, B. – Van Roy, N. – De Paepe, A. – Speleman, F.: 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*. 3. 7: 1.
207. Varasteh, S. – Braber, S. – Akbari, P. – Garssen, J. – Fink-Gremmels, J.: 2015. Differences in susceptibility to heat stress along the chicken intestine and the protective effects of galacto-oligosaccharides. *PloS One*. 10. 9: e0138975.
208. Walter, L. J. – Gasch, C. A. – McEvers, T. J. – Hutcheson, J. P. – DeFoor, P. – Marquess, F. L. S. – Lawrence, T. E.: 2014. Association of pro-melanin concentrating hormone genotype with beef carcass quality and yield. *Journal of Animal Science*. 92. 1: 325–331.
209. Wang, J. – Chen, L. – Li, D. – Yin, Y. – Wang, X. – Li, P. – Dangott, L. J. – Hu, W. – Wu, G.: 2008. Intrauterine growth restriction affects the proteomes of the small intestine, liver, and skeletal muscle in newborn pigs. *The Journal of Nutrition*. 138. 1: 60–66.

210. Webster, A. B.: 1995. Immediate and subsequent effects of a short fast on the behavior of laying hens. *Applied Animal Behaviour Science*. 45. 3: 255–266.
211. Xie, L. – Miyazaki, J. – Hirabayashi, T.: 1991. Identification and distribution of tropomyosin isoforms in chicken digestive canal. *The Journal of Biochemistry*. 109. 6: 872–878.
212. Yamada, S. – Mikami, S.: 1985. Immunohistochemical Localization of Corticotropin–Releasing Factor (CRF)–Containing Neurons in the Hypothalamus of the Japanese Quail, *Coturnix Coturnix*. *Cell and Tissue Research*. 239. 2: 299–304.
213. Yamamoto, I. – Nakao, N. – Kaiya, H. – Miyazato, M. – Tsushima, N. – Arai, T. – Tanaka, M.: 2011. Two chicken neuromedin U receptors: Characterization of primary structure, biological activity and tissue distribution. *General and Comparative Endocrinology*. 174. 2: 116–123.
214. Yamauchi, K. – Kamisoyama, H. – Isshiki, Y.: 1996. Effects of fasting and refeeding on structures of the intestinal villi and epithelial cells in White Leghorn hens. *British Poultry Science*. 37. 5: 909–921.
215. Yang, F. – Lei, X. – Rodriguez–Palacios, A. – Tang, C. – Yue, H.: 2013. Selection of reference genes for quantitative real–time PCR analysis in chicken embryo fibroblasts infected with avian leukosis virus subgroup J. *BMC Research Notes*. 6. 1: 1.
216. Yasuhara, T. – Mizuno, K. – Somogyvari–Vigh, A. – Komaki, G. – Arimura, A.: 1992. Isolation and primary structure of chicken PACAP. *Regulatory Peptides*. 37. 3: 326.
217. Yi, J. – Gilbert, E. R. – Siegel, P. B. – Cline, M. A.: 2015. Fed and fasted chicks from lines divergently selected for low or high body weight have differential hypothalamic appetite–associated factor mRNA expression profiles. *Behavioural Brain Research*. 286. 58–63.
218. Yin, R. – Liu, X. – Liu, C. – Ding, Z. – Zhang, X. – Tian, F. – Liu, W. – Yu, J. – Li, L. – de Angelis, M. H.: 2011. Systematic selection of housekeeping genes for gene expression normalization in chicken embryo fibroblasts infected with Newcastle disease virus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 413. 4: 537–540.

219. 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.
220. Yuan, L. – Ni, Y. – Barth, S. – Wang, Y. – Grossmann, R. – Zhao, R.: 2009. Layer and broiler chicks exhibit similar hypothalamic expression of orexigenic neuropeptides but distinct expression of genes related to energy homeostasis and obesity. *Brain Research*. 1273. 18–28.
221. Yue, H. – Lei, X. – Yang, F. – Li, M. – Tang, C.: 2010. Reference gene selection for normalization of PCR analysis in chicken embryo fibroblast infected with H5N1 AIV. *Virologica Sinica*. 25. 6: 425–431.
222. Zentel, H. – Nohr, D. – Muller, S. – Yanaihara, N. – Weihe, E.: 1990. Differential Occurrence and Distribution of Galanin in Adrenal Nerve–Fibers and Medullary Cells in Rodent and Avian Species. *Neuroscience Letters*. 120. 2: 167–170.
223. Zhang, S. – Blache, D. – Vercoe, P. E. – Adam, C. L. – Blackberry, M. A. – Findlay, P. A. – Eidne, K. A. – Martin, G. B.: 2005. Expression of orexin receptors in the brain and peripheral tissues of the male sheep. *Regulatory Peptides*. 124. 1–3: 81–87.
224. Zhang, W. – Kim, S. – Settlage, R. – McMahon, W. – Sumners, L. H. – Siegel, P. B. – Dorshorst, B. J. – Cline, M. A. – Gilbert, E. R.: 2015. Hypothalamic differences in expression of genes involved in monoamine synthesis and signaling pathways after insulin injection in chickens from lines selected for high and low body weight. *Neurogenetics*. 16. 2: 133–144.
225. Zhang, Y. – Zanotti, I. – Reilly, M. P. – Glick, J. M. – Rothblat, G. H. – Rader, D. J.: 2003. Overexpression of apolipoprotein A–I promotes reverse transport of cholesterol from macrophages to feces *in vivo*. *Circulation*. 108. 6: 661–663.
226. Zheng, H. – Patterson, L. – Phifer, C. – Berthoud, H.: 2005. Brain stem melanocortinergic modulation of meal size and identification of hypothalamic POMC projections. *American Journal of Physiology–Regulatory Integrative and Comparative Physiology*. 289. 1: R247–R258.
227. Zhou, H. – Clapham, D. E.: 2009. Mammalian MagT1 and TUSC3 are required for cellular magnesium uptake and vertebrate embryonic development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106. 37: 15750–15755.

228. Zhou, W. – Murakami, M. – Hasegawa, S. – Yoshizawa, F. – Sugahara, K.: 2005. Neuropeptide Y content in the hypothalamic paraventricular nucleus responds to fasting and refeeding in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. 141. 2: 146-152.
229. Zuehlke, A. D. – Beebe, K. – Neckers, L. – Prince, T.: 2015. Regulation and function of the human *HSP90AA1* gene. *Gene*. 570. 1: 8–16.
230. Internet 1: <http://ec.europa.eu/eurostat/web/agriculture/data/database>
231. Internet 2:
http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0059_baromfitenyesztes/ch07s02.html
232. Internet 3:
http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/2011_0001_521_A_takarmanyozas_alapjai/ch09s05.html
233. Internet 4: <http://www.roysfarm.com/wp-content/uploads/2014/03/Chicken+Digestive+System.jpg>
234. Internet 5: <http://www.agr.unideb.hu/animaldb/baromfi/tyuk/h4.htm>
235. Internet 6:
http://eu.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Hungarian_TechDocs/Ross-308-Broiler-PO-2014-HU.pdf
236. Internet 7: http://avianbrain.org/nomen/Chicken_Atlas.html



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., Jávor, 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 Biológiai tudomány 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., Jávor, 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.**, Jávor, 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., Jávor, 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., Jávor, 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 aktíváló 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., Resetár, 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., Csósz, 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., Csósz, 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., Jávor, 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., Jávor, 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., Jávor, A., Gulyás, G., Czeglédi, L.: Kapilláris elektroforézis - egyszálú konformációs DNS polimorfizmus (CE-SSCP) módszer alkalmazása a házigalamb (*Columba livia domestica*) DNS mintázatának meghatározásához.
In: Tavasz Szél Konferencia, Eger 2015. április 10-12. : Absztraktkötet 2015, Publio Kiadó, Budapest, 42, 2015. ISBN: 9789633977026
23. **Simon, Á.**, Gulyás, G., Csikós, Á., Jávor, A., Czeglédi, L.: A szarvasmarha szőrszint befolyásoló MC1R génváltozatok 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., Jávor, 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.



MELLÉKLETEK

1 melléklet

Háziállat referenciagén stabilitásvizsgálatok 2004-2016 között

Év	vizsgált gén (db)	digitális objektum azonosító (DOI)	Év	vizsgált gén (db)	digitális objektum azonosító (DOI)
2004	4	10.1111/j.1439-0442.2004.00667.x	2012	4	10.1186/1743-422X-9-230
2005	6	10.1186/1746-6148-2-26	2012	7	10.1016/j.vetimm.2011.12.017
2005	8	10.1186/1471-213X-5-27	2012	5	10.3923/javaa.2012.3064.3067
2006	8	10.1186/1472-6750-6-24	2012	4	10.1186/1743-422X-9-230
2006	8	10.3168/jds.S0022-0302(06)72450-X	2012	7	10.1016/j.vetimm.2011.12.017
2006	11	10.1186/1472-6750-6-41	2012	9	10.1186/2049-1891-3-36
2007	9	10.1152/physiolgenomics.00223.2006	2012	5	10.3390/ijms131114344
2007	8	10.3168/jds.2006-640	2012	13	10.1016/j.repbio.2012.10.010
2007	7	10.1186/1471-213X-7-58	2012	9	10.1007/s11033-012-1642-8
2007	9	10.1186/1471-2199-8-67	2012	8	10.3168/jds.2011-4803
2007	7	10.1016/j.vetimm.2007.04.010	2012	6	10.1089/dna.2011.1249
2007	4	10.1016/j.vetimm.2006.09.012	2013	9	10.1007/s12033-012-9604-x
2008	9	10.1186/1471-2199-9-49	2013	11	10.1016/j.tvjl.2013.05.020
2008	5	10.1016/j.vetimm.2007.12.002	2013	10	10.1017/S0967199413000099
2008	6	10.1007/BF03195635	2013	10	10.1371/journal.pone.0066023
2008	13	10.1186/1471-2199-9-67	2013	9	10.1371/journal.pone.0083041
2008	10	10.1186/1471-2199-9-79	2013	8	10.1111/rda.12112
2008	4	10.1007/BF03195623	2013	11	10.1186/1756-0500-6-402
2008	13	10.3168/jds.2008-1164	2013	8	10.5713/ajas.2013.13199
2009	8	10.1017/S0967199410000080	2013	8	10.1017/S1751731113000475
2009	7	10.1111/j.1439-0396.2010.01002.x	2013	10	10.1016/j.vetimm.2013.03.004
2009	6	10.1186/1471-2199-10-72	2013	13	10.1556/AVet.2013.037
2009	8	10.1186/1756-0500-2-246	2013	14	10.3168/jds.2012-6383
2009	15	10.1186/1471-2199-10-100	2013	6	10.1186/1746-6148-9-240
2009	6	10.1016/j.vetimm.2009.01.012	2013	11	10.3390/ijms140611484
2009	17	10.3168/jds.2008-1655	2014	8	10.1016/j.livsci.2013.12.031
2009	8	10.1080/10495390903323851	2014	11	10.1016/j.gene.2014.07.063
2010	8	10.1016/j.vetimm.2010.05.006	2014	10	10.1371/journal.pone.0089331
2010	10	10.1016/j.jbiotec.2010.09.949	2014	5	10.3168/jds.2013-7220
2010	9	10.1016/j.meatsci.2010.05.030	2014	12	10.1111/ahc.12128
2010	10	10.1186/scrt7	2014	7	10.1186/1477-7827-12-118
2010	3	10.1590/S1415-47572010000300018	2014	10	10.1371/journal.pone.0093287
2010	9	10.1007/s13258-010-0114-6	2014	14	10.1371/journal.pone.0099678
2010	6	10.1089/cell.2010.0036	2014	8	10.1152/physiolgenomics.00030.2014
2010	7	10.1111/j.1439-0396.2010.01002.x	2014	6	10.1071/RD14089
2010	11	10.1007/s12250-010-3114-4	2014	6	10.5713/ajas.2013.13471
2011	7	10.1186/1471-2199-12-5	2015	5	10.1016/j.gene.2015.02.016
2011	10	10.3168/jds.2010-3859	2015	4	10.1371/journal.pone.0139688
2011	13	10.1016/j.vetimm.2011.01.005	2015	11	10.1186/s12865-015-0099-7
2011	5	10.1016/j.smallrumres.2010.08.008	2015	8	10.1016/j.gene.2015.05.050
2011	20	10.1111/j.1439-0388.2011.00920.x	2015	12	10.1155/2015/235192
2011	8	10.1016/j.anireprosci.2011.02.019	2015	7	10.1089/cell.2015.0024
2011	5	10.1186/1756-0500-4-120	2015	12	10.3892/mmr.2015.3776
2011	5	10.3390/ijms12031727	2015	6	10.1016/j.livsci.2015.09.010
2011	2	10.1111/j.1439-0531.2011.01934.x	2015	14	10.1371/journal.pone.0127935
2011	7	10.3168/jds.2011-4147	2015	15	10.1016/j.gene.2014.12.052
2011	8	10.1016/j.jbiotec.2011.04.002	2015	8	10.1186/s12863-015-0197-9
2011	11	10.1016/j.vetpar.2011.04.009	2015	8	10.1371/journal.pone.0121280
2011	7	10.17221/1428-CJAS	2015	12	10.3892/mmr.2015.4128
2011	11	10.3390/ijms12117732	2015	5	10.1186/s12917-015-0382-0
2011	9	10.3390/7501/66/strona53-64.pdf	2015	16	10.1016/j.gene.2015.04.016
2011	8	10.1016/j.meatsci.2010.10.008	2016	7	10.1016/j.vetimm.2016.01.001
2011	16	10.1186/1471-2199-12-36	2016	5	10.3347/kjp.2016.54.1.39
2011	7	10.1016/j.tvjl.2010.11.017	2016	9	10.1089/vim.2015.0130
2011	9	10.1186/1756-0500-4-441	2016	31	10.3390/ijms12031727
2011	7	10.1016/j.vetimm.2011.07.004	2016	8	10.1016/j.vetimm.2015.10.010
2011	8	10.1016/j.bbrc.2011.08.131	2016	8	10.1186/s13567-016-0388-z
2011	7	10.3923/ajava.2011.789.804	2016	5	10.1016/j.jviromet.2016.07.017
2011	4	10.1071/RD10039	2016	10	10.1371/journal.pone.0160173
2012	9	10.1186/1756-0500-5-107	2016	4	10.2460/ajvr.77.10.1148
2012	5	10.3923/javaa.2012.3064.3067	2016	5	10.1038/srep26476

Az állatkísérleti engedély

DEBRECENI EGYETEM
MUNKAHELYI ÁLLATJÓLÉTI
BIZOTTSÁG

Elnök: Prof. Dr. Furka István



UNIVERSITY OF DEBRECEN
COMMITTEE OF ANIMAL
WELFARE

Head: Prof. István Furka, M.D., D.Sc.

Iktatószám: DEMAB/12-7/2015.
Tételszám: 16.18
Tárgy: 3-1/2015/DEMÁB állatkísérlet
engedély
Melléklet: 1 db határozat

DR. CZEGLÉDI LEVENTE
egyetemi adjunktus Úr

DE Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és
Környezetgazdálkodási Kar
Helyben

Tisztelt Adjunktus Úr!

Tájékoztatom, hogy a „*Baromfi takarmányozásával, takarmányfelvételével kapcsolatos molekuláris markerek tanulmányozása*” tárgyú állatkísérletek végzése iránti kérelmét a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottsága (DE MÁB) 3-1/2015/DEMÁB számon vette nyilvántartásba.

A kérelmet a Bizottság (DEMÁB) jóváhagyás után, engedélyezés végett a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági, Növény- és Talajvédelmi Főosztályához továbbította.

Értesítem, hogy a Hajdú-Bihar Megyei Kormányhivatal Élelmiszerlánc-biztonsági, Növény- és Talajvédelmi Főosztályának megyei főállatorvosa Rácz Róbert kormány megbízott nevében és megbízásából a HBI/01/4687-3/2015. számú levelében – az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács (Budapest) döntését figyelembe véve a

3-1/2015/DEMÁB számon

nyilvántartott kísérletet – kérésének megfelelően –

5 évi időtartamra engedélyezi.

(2014. augusztus 14. – 2020. december 14.)

Jelen ügyirat a kérelem irataihoz csatolva képezi az állatkísérlet végzésének hatósági engedélyét.


A kísérlet időtartama alatt minden naptári év végén, az év folyamán kísérletben felhasznált állatok számáról statisztikai jelentést kell készíteni.

Kérjük, hogy a kísérlet befejezését a DEMÁB-hoz bejelenteni szíveskedjék.

Debrecen, 2015. augusztus 28.

Üdvözlettel:




Prof. Dr. Furka István
egyetemi tanár
DE MÁB elnök

H-4032 Debrecen, Móricz Zs. krt. 22. * ☒: H-4012 Debrecen, Pf. 95. * ☎: +36 52 419-288
Fax: +36 52 419-288 * ✉: demab@med.unideb.hu

A vegyszerek jegyzéke

vegyszer	katalógusszám, gyártó
40%-os akrilamid oldat (37,5:1)	A0857.1000, AppliChem
AccuGENE RNáz-, DNáz-mentes víz	51223, Lonza
ammónium-persulfát	A3678-25G, Sigma-Aldrich
brómfenolkék	1610404, Bio-Rad
BSA	A7906-50G, Sigma-Aldrich
DAPI	62248, Thermo Fisher Scientific
Direct-zol RNA miniprep	R2050, Zymo Research
ecetsav	27221-1L, Sigma-Aldrich
ECL reagens, SuperSignal West Femto	34094, Thermo Fisher Scientific
GeneRuler 50 bp DNS marker	SM0373, Thermo Fisher Scientific
glicerin	G5516, Sigma-Aldrich
glicin	G8898-500G, Sigma-Aldrich
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit	K1642, Thermo Fisher Scientific
metanol	179957-1L, Sigma-Aldrich
N,N,N',N'-tetrametil-etiléndiamin	T7024-100ML, Sigma-Aldrich
nátrium-klorid	S7653, Sigma-Aldrich
PageRuler Prestained Protein Ladder	26616, Thermo Fisher Scientific
PBS	17-517Q, Lonza
Power SYBR Green mastermix	4367659, Thermo Fisher Scientific
primerek	IDT-000, Integrated DNA Technologies
ProteoBlock proteáz gátló koktél	R1321, Thermo Fisher Scientific
qPCRBIO cDNA Synthesis Kit	PB30.11-10, PCR Biosystems
RC DC assay	5000122, Bio-Rad
RNeasy Mini Kit	74104, Qiagen
SDS	83886.290, VWR
TRI reagens	T9424, Sigma-Aldrich
trisz-hidroximetil-amino-metán	AC0965, Scharlau
triton-x	T8787, Sigma-Aldrich
tween-20	P9416-50ML, Sigma-Aldrich
urea	U5378-500G, Sigma-Aldrich
Xceed qPCR SG Hi-ROX mastermix	HPCR10501L, Institute of Applied Biotechnologies
β-merkaptóetanol	M6250-100ML, Sigma-Aldrich

A kísérletek során használt oligonukleotid primerek és amplikonok tulajdonságai

gén	kódolt fehérje	szekvencia azonosító	primer szekvenciák (5'-3' irány, F: forward és R: reverz)	hatékonyság (E)*	amplikon (bp)	amplikon a gDNS-en (bp)	olvadáspont (°C)
<i>ACTB</i>	béta aktin	NM_205518.1	F: AGATCACAGCCCTGGCACCTAG R: TTGCGCTCAGGTGGGGCAAT	1,920	61	416	80,9
<i>ADCYAP1 (PACAP)</i>	hipofízis adenilát cikláz aktiváló peptid	NM_001001291.2	F: TAGACGGCATCTTCACGGACA R: GCTACTCGGCGTCCTTTTGT	1,810	124	124	79,7
<i>B2M</i>	béta-2-mikroglobulin	XM_015279077.1	F: ATCCCGAGTTCTGAGCTGTGC R: CCGTCATACCCAGAAGTGCGAT	1,888	115	1098	83,2
<i>GAL</i>	galanin	NM_001159678.1	F: TAATCCTTTGTGCCGCCCTG R: TCAATACGACGTGGCCCAAG	1,999	112	773	79,4
<i>GAPDH</i>	gliceraldehyd-3- foszfát dehidrogenáz	NM_204305.1	F: GCTGGCATTGCACTGAATGAC R: CACTCCTTGGATGCCATGT	1,853	113	470	82,3
<i>GLUT1</i>	glükóz transzporter 1	NM_205209.1	F: GACCTTCCACCAGCTCGGCAT R: GCCAGAGCGAGTCGTTTCCCATGA	1,858	89	485	76,6
<i>GLUT2</i>	glükóz transzporter 2	NM_207178.1	F: CGTCACAGGCATCCTCATCAGC R: CAGAGCAGCCACCCCGGACA	1,908	103	677	86,7

A kísérletek során használt oligonukleotid primerek és amplikonok tulajdonságai (folytatás)

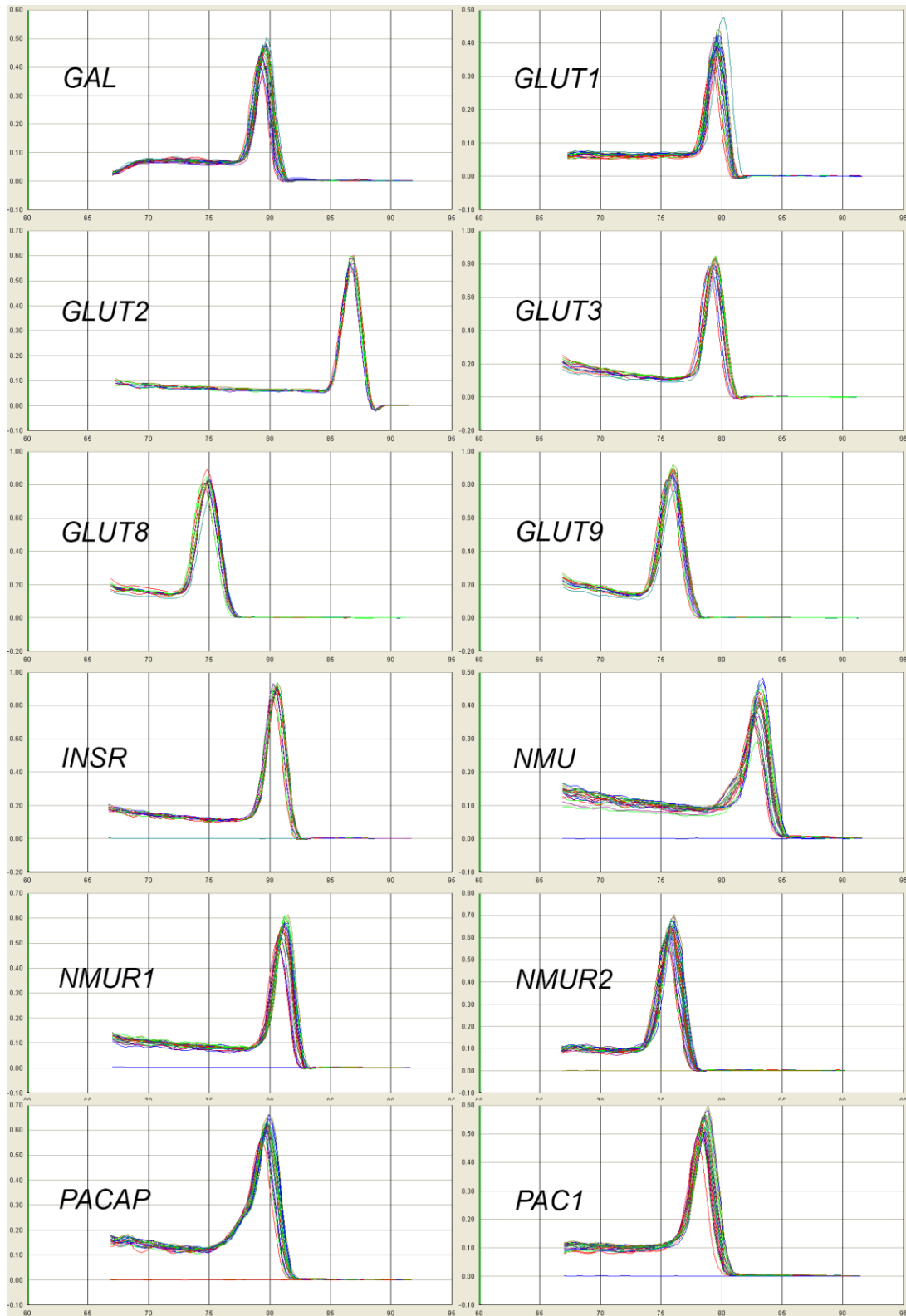
gén	kódolt fehérje	szekvencia azonosító	primer szekvenciák (5'-3' irány, F: forward és R: reverz)	hatékonyság (E)*	amplikon (bp)	amplikon a gDNS-en (bp)	olvadáspont (°C)
<i>GLUT3</i>	glükóz transzporter 3	NM_205511.1	F: CTTCTTTTCTGCCCTGAGAGCCC R: ACATCCTGTGTACCACGGAGCTT	1,913	101	732	79,6
<i>GLUT8</i>	glükóz transzporter 8	NM_204375.1	F: TGCAGTGGTAAGCCTAGGACTCT R: ACTGCTTGATACACCCCTTGCT	1,840	115	1025	74,6
<i>GLUT9</i>	glükóz transzporter 9	XM_420789.5	F: CATGGTAGCTGGGACAGTCAACT R: AGCAGATGGCAGCAAACACGAGG	1,891	113	12577	75,8
<i>HMBS</i>	hidroximetilbilán szintáz	XM_417846.5	F: GCCTGAAGGAAACAATGCAGA R: GCTGTGATGCCAACATGCT	1,886	91	543	81,2
<i>INSR</i>	inzulinreceptor	XM_001233398.3	F: TTGTTCTGTCTAAAACCGACT R: CAATGGAGCCCAGGTCTCTTC	1,822	140	3911	80,4
<i>LBR</i>	lamin B receptor	NM_205342.1	F: AAGGCACCTGAGGAAGACCTA R: AAACCTGCCAATACGAGGGTTC	1,908	98	1032	80,7
<i>MCHR4</i> (Cui és mtsai., 2017)	melanin koncentráló hormon receptor 4	KY196444.1	F: GCACAATTTCTCCACGTCGG R: CAACGCCCAGGAAACAGATG	1,893	113	113	84,4
<i>NMU</i>	neuromedin U	NM_001277921.1	F: CTTCTCTTCCTCCTCGCCTC R: GTTCCTGCTCTGCCTCCAAC	1,857	82	2164	83,1
<i>NMUR1</i>	neuromedin U receptor 1	XM_004943371.1	F: ACAGCGACTATCACAGAGTCCG R: GCCCAGCAGATCCCAAACAC	1,825	100	584	81
<i>NMUR2</i>	neuromedin U receptor 2	XM_425209.4	F: AGTGTGCTGTACTATCTGATGGG R: GCCTCTGAACATTCACGGACA	1,895	85	4493	75,8

A kísérletek során használt oligonukleotid primerek és amplikonok tulajdonságai (folytatás)

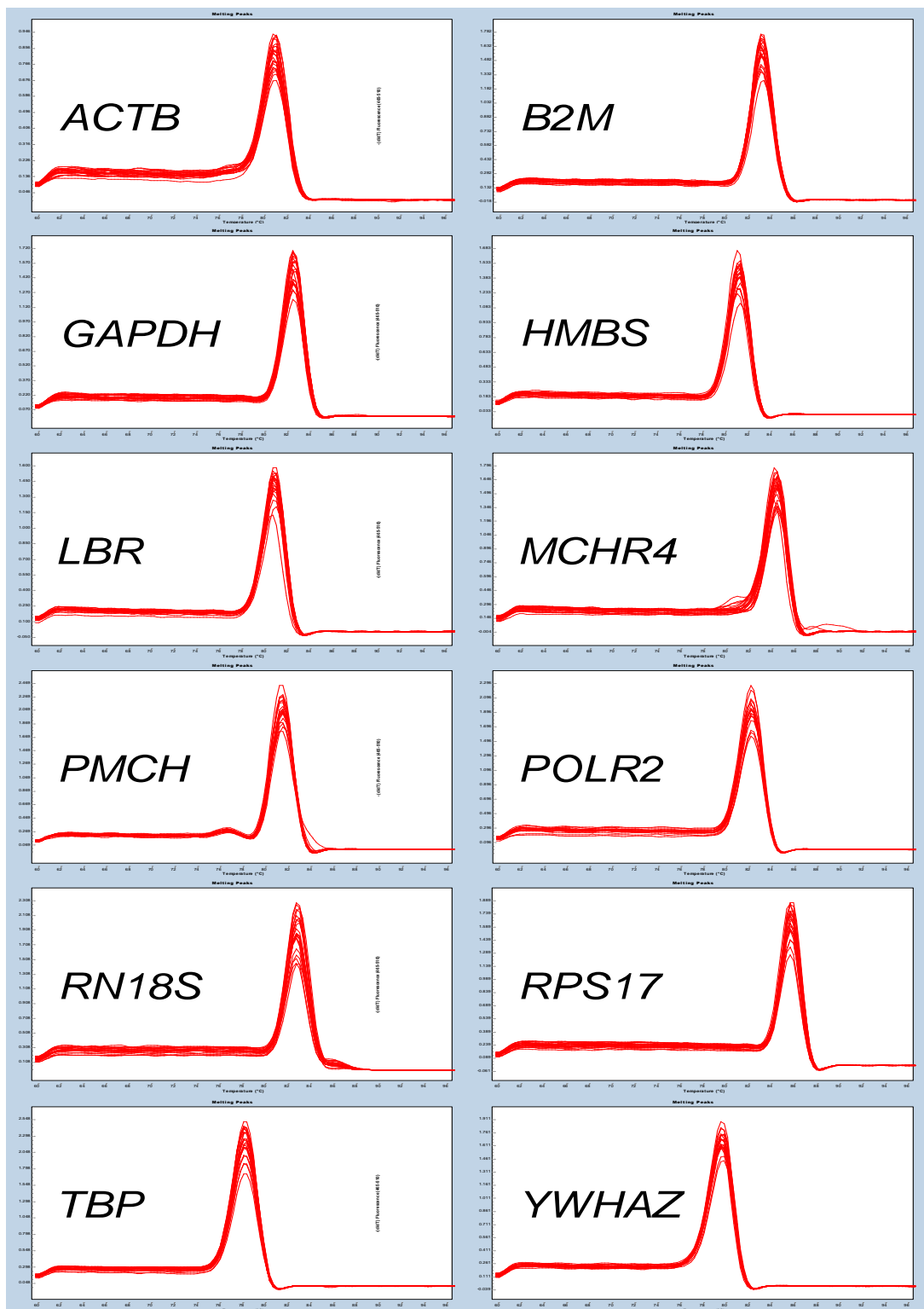
gén	kódolt fehérje	szekvencia azonosító	primer szekvenciák (5'-3' irány, F: forward és R: reverz)	hatékonyság (E)*	amplikon (bp)	amplikon a gDNS-en (bp)	olvadáspont (°C)
<i>PAC1</i>	PACAP receptor 1-es típus	NM_001098606.1	F: CCAGTCACCTGATATTGGAGGC R: AGTCTCTCCCGCTTACTGACA	1,802	141	19442	78,5
<i>PMCH</i>	pre-melanin koncentráló hormon	NM_001195795.1	F: CAGCTAAATTCCCATAGGAAGG R: CAAAGAAGGTGCTGTAAGTCAGT	1,877	114	399	81,5
<i>POLR2B</i>	RNS polimeráz II polipeptid B	NM_001006448.1	F: ACACGTATGAATGCCGGGGA R: GGTGCAATGCTCATAGACATCA	1,919	110	1262	82,1
<i>RN18S</i>	18S riboszómális RNS	AF173612.1	F: CTCCTTCTCGATTCCGTGGGT R: CATGCCAGAGTCTCGTTCGT	1,907	96	96 (egy exon)	82,9
<i>RPS17</i>	S17 riboszómális fehérje	NM_204217.1	F: TCCGGGGTATCTCCATTAAGCTG R: CATTTCCTTGGTGTCCGGGTC	1,901	119	1177	85,7
<i>TBP</i>	TATA box kötő fehérje	NM_205103.1	F: ATCAAGCCAAGAATTGTTCTGC R: CTTCGTAGATTTCTGCTCGAACT	1,887	85	981	78,2
<i>YWHAZ</i>	tirozin 3-monooxigenáz triptofán 5 monooxigenáz aktiváló fehérje zéta	NM_001031343.1	F: AGTCATACAAAGACAGCACGCTA R: GCTTCATCTCCTTGGGTATCCGA	1,886	85	416	79,6
Ivarmeghatározás (Li és mtsai., 2012)							
	W-Z kromoszómák homológ szakasza	EST CV854162	F: CCATGGGAAGATCTCCAAAC				
	W kromoszóma	NC_006127	R _w : CTGTCTGATTCCCCCTAATGTAA		202		
	Z kromoszóma	NC_006128	R _z : AGACAATGCATACAAGGGCTTT		107		

5. melléklet

A qPCR specificitását olvadási görbékkel ellenőriztem. A 10 referencia- és 2 célgén esetén specifikus reakciót kaptam. Y tengely a fluoreszcencia intenzitás negatív deriváltját, X tengely a hőmérsékletet (°C) jelöli.



A qPCR specificitását olvadási görbékkel ellenőriztem (folytatás).



Referenciagének a háztyúk génexpressziós kísérletekben

#	normalizáláshoz használt referenciagén	db	stabilitást vizsgálták	digitális objektum azonosító (DOI)
1	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.domaniend.2015.12.003
2	<i>B2M, POLR2, TBP</i>	3	nem	10.1016/j.ygcen.2016.02.010
3	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0125816
4	<i>TBP</i>	1	nem	10.1016/j.ygcen.2016.02.008
5	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1007/s00429-014-0923-5
6	<i>GAPDH</i>	1	igen	10.1371/journal.pone.0143418
7	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1007/s12011-015-0455-8
8	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1007/s12011-015-0487-0
9	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0143298
10	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1186/s12917-015-0609-0
11	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.cbpa.2015.08.002
12	<i>ACTB, GAPDH</i>	2	nem	10.1007/s12011-015-0486-1
13	<i>RN18S</i>	1	nem	10.1016/j.ygcen.2016.03.007
14	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1534/g3.116.028498
15	<i>RN18S</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0142319
16	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1007/s11033-014-3753-x
17	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.etap.2015.01.016
18	<i>RN18S</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0141062
19	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.mce.2015.09.007
20	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.domaniend.2014.09.001
21	<i>ACTB, GAPDH</i>	2	nem	10.1074/jbc.m114.601401
22	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1089/vim.2015.0054
23	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1089/scd.2015.0208
24	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.3382/ps/peu064
25	<i>ACTB</i>	1	nem	10.3945/jn.115.214338
26	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0138975
27	<i>ACTB, PPID</i>	2	nem	10.1038/srep20837
28	<i>ACTB, GAPDH</i>	2	nem	10.1016/j.mcp.2015.12.003
29	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.mce.2014.10.015
30	<i>ACTB</i>	1	igen	10.1080/00071668.2015.1058920
31	<i>ACTB, GAPDH</i>	2	nem	10.1371/journal.pone.0140499
32	<i>B2M, TBP</i>	2	nem	10.1038/srep15345
33	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0146028
34	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1590/1516
35	<i>UBC</i>	1	nem	10.2460/ajvr.76.11.975
36	<i>RN18S</i>	1	nem	10.1016/j.toxlet.2015.09.005
37	<i>ACTB</i>	1	nem	10.3382/ps/pev362

Referenciagének a házityúk génexpressziós kísérletekben (folytatás)

38	<i>ACTB, GAPDH</i>	2	nem	10.2527/jas.2014-8165
39	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1590/s0100-736x2015000900003
40	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0119750
41	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1007/s00484-014-0829-1
42	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1007/s00774-014-0563-0
43	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1017/s0007114514003535
44	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.4142/jvs.2015.16.4.423
45	<i>ACTB, GAPDH</i>	2	nem	10.1186/s12864-014-1202-9
46	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.vetimm.2015.12.010
47	<i>ACTB</i>	1	nem	10.3184/175815515x14370479509643
48	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.vetimm.2014.12.005
49	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1242/dev.119149
50	<i>GAPDH</i>	1	igen	10.3109/10253890.2015.1083551
51	<i>RN18S</i>	1	nem	10.1016/j.ygcen.2014.12.022
52	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1007/s12011-015-0462-9
53	<i>RN18S</i>	1	nem	10.2141/jpsa.0150062
54	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.biochi.2016.04.017
55	<i>PPIA</i>	1	nem	10.1038/srep18321
56	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0131474
57	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1083/jcb.201503071
58	<i>ACTB</i>	1	nem	10.5713/ajas.15.0252
59	<i>RPS17</i>	1	nem	10.1210/en.2015-1634
60	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.acthis.2015.06.004
61	<i>B2M, GAPDH, HRPT1, PPIA, TBP, YWHAE</i>	6	igen	10.1016/j.vetimm.2015.01.003
62	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.vetimm.2015.06.006
63	<i>RN18S</i>	1	nem	10.1016/j.livsci.2015.10.005
64	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0122643
65	<i>ACTB</i>	1	igen	10.1017/s1751731114002262
66	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.rvsc.2015.10.005
67	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1007/s11010-014-2249-2
68	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.brainres.2016.01.038
69	<i>B2M, POLR2, TBP</i>	3	nem	10.1530/rep-15-0253
70	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1080/03079457.2015.1086725
71	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1007/s00251-014-0810-5
72	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1186/s12985-016-0499-1
73	<i>GAPDH</i>	1	igen	10.1016/j.ygcen.2014.11.009
74	<i>POLR2</i>	1	igen	10.1016/j.physbeh.2015.06.033
75	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1007/s00484-015-0968-z
76	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1080/00071668.2015.1041098
77	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1080/00071668.2015.1099615
78	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.apjr.2016.04.007

Referenciagének a házityúk génexpressziós kísérletekben (folytatás)

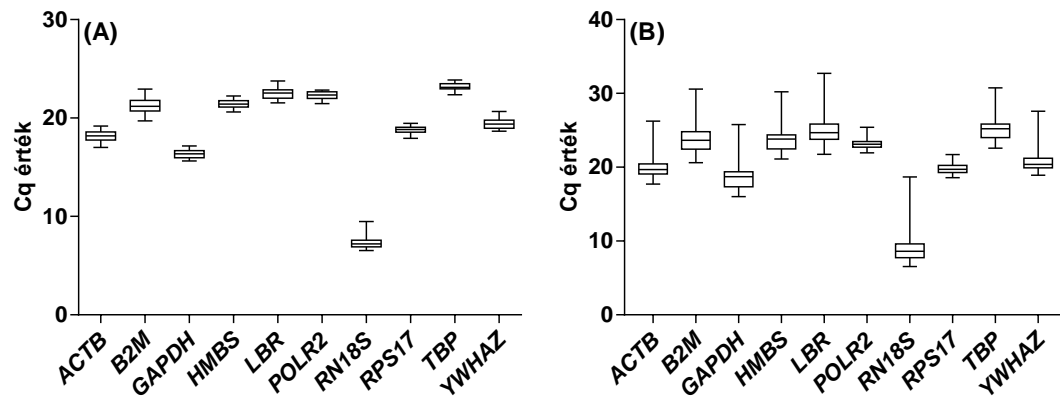
79	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.theriogenology.2015.09.028
80	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1007/s12011-015-0354-z
81	<i>ACTB</i>	1	igen	10.1016/j.parint.2015.06.010
82	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1039/c5fo01338k
83	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.dci.2016.01.008
84	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1007/s12192-015-0625-9
85	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.molimm.2014.11.013
86	<i>GAPDH</i>	1	igen	10.3382/ps/pev193
87	<i>RN18S</i>	1	igen	10.1007/s00360-015-0957-x
88	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.9775/kvfd.2016.15213
89	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.chemosphere.2016.03.081
90	<i>RPL4, SDHA</i>	2	igen	10.1080/00071668.2015.1058918
91	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1007/s10534-014-9812-x
92	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.rvsc.2015.10.015
93	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1007/s13353-014-0246-5
94	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1631/jzus.b1400255
95	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1007/s11259-014-9621-2
96	<i>RN18S</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0126992
97	<i>ATP5B, GAPDH, MDH1, RPL13, YWHAZ</i>	5	igen	10.1155/2015/347245
98	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.molimm.2015.10.013
99	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0139131
100	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.3382/ps/pev335

Referenciagének a házityúk génexpressziós (éhezés) kísérletekben

#	normalizáláshoz használt referenciagén	db	stabilitást vizsgálták	digitális objektum azonosító (DOI)
1	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.gene.2015.06.022
2	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1371/journal.pone.0127107
3	<i>POLR2</i>	1	igen	10.1016/j.cbpa.2012.08.009
4	<i>ACTB, RN18S</i>	1	nem	10.1016/j.domaniend.2011.08.001
5	<i>ACTB</i>	1	nem	10.2527/jas.2010-3339
6	<i>ACTB</i>	1	igen	10.2527/jas.2011-3897
7	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.cbpa.2015.08.004
8	<i>GAPDH, RN18S</i>	2	nem	10.3109/10253890.2011.639413
9	<i>RN18S</i>	1	nem	10.3109/10253890.2010.543444
10	<i>RN18S</i>	1	nem	10.1016/j.cbpb.2015.04.007
11	<i>ACTB, GAPDH</i>	2	igen	10.3382/ps.2014-04047
12	<i>RPS17</i>	1	nem	10.1016/j.cbpb.2015.07.002
13	<i>RN18S</i>	1	nem	10.5713/ajas.2012.12153
14	<i>GAPDH, RN18S</i>	2	igen	10.1186/s40104-016-0084-x
15	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1007/s11427-011-4226-2
16	<i>RN18S</i>	1	igen	10.1016/j.cbpb.2010.07.001
17	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.3382/ps/pev315
18	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.2141/jpsa.0150036
19	<i>RN18S</i>	1	nem	10.1016/j.cbpb.2015.10.007
20	<i>RPS17</i>	1	nem	10.1016/j.cbpb.2013.03.005
21	<i>RPS17</i>	1	nem	10.1016/j.cbpb.2013.06.003
22	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1111/jne.12333
23	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.3382/ps.2010-01173
24	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.domaniend.2014.09.006
25	<i>RN18S</i>	1	nem	10.1016/j.npep.2014.04.007
26	<i>ACTB</i>	1	igen	10.1016/j.physbeh.2011.06.023
27	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.bbr.2015.02.008
28	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.cbpa.2012.07.010
29	<i>GAPDH</i>	1	igen	10.2141/jpsa.010093
30	<i>RPS17</i>	1	nem	10.2141/jpsa.0150011
31	<i>RN18S</i>	1	igen	10.1186/2049-1891-4-43
32	<i>ACTB</i>	1	nem	10.7717/peerj.2129
33	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.ygcn.2014.08.010
34	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.2141/jpsa.009110
35	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.cbpa.2010.01.011
36	<i>ACTB, CYTB</i>	2	nem	10.1371/journal.pone.0139517
37	<i>GAPDH</i>	1	nem	10.1016/j.neuroscience.2011.09.007
38	<i>RN18S</i>	1	nem	10.2141/jpsa.0140135
39	<i>RPS17</i>	1	nem	10.1111/asj.12392
40	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1016/j.ygcn.2016.01.004
41	<i>TUBB</i>	1	nem	10.1186/1471-2164-13-441
42	<i>ACTB</i>	1	nem	10.1038/ijo.2011.221

8. melléklet

A 10 referenciagén- jelölt C_q értéke az éhezés-újraetetés kísérletekben (A) és a növekedés hatására (B). A doboz ábrák az interkvartilis értékeket (25-75%), valamint a mediánt jelölik, míg a hibasávok a minimum és maximum értékeket.



KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom témavezetőmnek **Dr. Czeglédi Leventének**, az Állattenyésztési Tanszék tanszékvezető egyetemi docensének, amiért felelősségteljesen irányította és segítette a kutatási munkámat. Szakmai kapcsolataiból származó eredmények a dolgozat esszenciális részét képezik. Köszönettel tartozom **Dr. Jávor András** és **Dr. Komlósi István** professzor uraknak, amiért a kutatómunkámat az Állatgenetikai Laboratóriumban és az Állattenyésztési Tanszéken végezhettem. Köszönet illeti **Dr. Oláh Jánost** a Debreceni Egyetem, Debreceni Tangazdaság és Tájkutató Intézet, Állattenyésztési Kísérleti Telep és Tanüzem vezetőjét és munkatársait az állatkísérletek beállításában nyújtott segítségükért. Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Gulyás Gabriellának**, amiért megalapozta az Állatgenetikai Laboratóriumban zajló proteomikai vizsgálatokat. Elméleti és gyakorlati tudásának megosztásával önzetlenül segítette a munkámat. Köszönöm **Dr. Remenyik Juditnak** és munkatársainak (DE-MÉK, Élelmiszertechnológiai Intézet), hogy használhattam a korszerű mikrolemes olvasójukat. Köszönetem szeretném kifejezni **Dr. Balogh Péter** professzor úrnak (DE-GK, Ágazati Gazdaságtan és Módszertani Intézet) a statisztikai módszerekkel kapcsolatos hasznos tanácsaiért. Hálával tartozom **Csernus Brigittának**, **Kövér Vandának**, **Papp Eszternek**, **Szappanos Lilla Virágnak**, **Tisza Ákosnak** és **Zakarné Aszalós Zsuzsának** a minta- és adatgyűjtésben és a laboratóriumi kísérletek során nyújtott segítségükért.

Amiért használhattam a lézerszkennert és a gélképelemző szoftvert, köszönet illeti **Dr. Csósz Évát** és munkatársait (DE-ÁOK, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet). Köszönet illeti a Kassai Állatorvos-tudományi és Állatgyógyászati Gyógyszerészeti Egyetem docensét, **Dr. Mangesh Bhide-t** és csapatát, amiért elvégezték a tömegspektrometriás méréseket.

Köszönettel tartozom **Dr. Németh Józsefnek** (DE-ÁOK, Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet) a radioimmúnesszés mérések és **Dr. Mészár Zoltánnak** (DE-ÁOK, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet) a szövettani metszetek elkészítéséért.

Dr. Bay Péter professzor úrnak és munkatársainak (DE-ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet) hálával tartozom, amiért hozzáférhettem a korszerű qPCR gépükhöz.

Köszönöm családomnak és barátaimnak a bizalmukat és szeretetüket, amikből mindig erőt meríthettem.

Az értekezés elkészítését az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg. Az értekezés az Emberi Erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatásával készült.

NYILATKOZAT

Ezen értekezést a Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola keretében készítettem, a Debreceni Egyetem doktori (PhD) fokozatának elnyerése céljából.

Debrecen, 2018.07.11.

.....
Simon Ádám László
doktorjelölt

NYILATKOZAT

Tanúsítom, hogy **Simon Ádám László** doktorjelölt 2014-2018 között a fent megnevezett Doktori Iskola keretében irányításommal végezte munkáját. Az értekezésben foglalt eredményekhez a jelölt önálló alkotó tevékenységével meghatározóan hozzájárult, az értekezés a jelölt önálló munkája. Az értekezés elfogadását javaslom.

Debrecen, 2018.07.11.

.....
Dr. Czeglédi Levente
témavezető