

Debreceni Egyetem
Természettudományi és Technológiai Kar,
Hidrobiológiai Tanszék
Agrár Genomikai és Biotechnológiai Központ
Állatgenomikai kutatócsoport
Prof. Dr. Kusza Szilvia
egyetemi tanár, állatgenomikai kutatócsoport vezetője

**A gerincdeformitás – mint a ponty (*Cyprinus carpio* L.) fajban megjelenő
egészségügyi probléma – genetikai hátterének vizsgálata**

Készítette:
Balog Katalin
Hidrobiológus MSc hallgató

Témavezető:
Dr. Kusza Szilvia
egyetemi tanár
Dr. Bagi Zoltán
tudományos munkatárs

TDK dolgozat

Debrecen, 2021

Tartalomjegyzék

1. Témafelvetés	5
2. Irodalmi áttekintés.....	6
2.1. A gerincdeformitás.....	6
2.2. A csigolyák fejlődése.....	8
2.3. A vizsgált gének.....	9
2.4. A makro- és mikroelemek.....	16
2.5. A gerincdeformitással kapcsolatos vizsgálatok halakban.....	20
3. Anyag és módszer	23
3.1. Mintavétel	23
3.2. RNS izolálás, cDNS átírás	23
3.3. qPCR (Valós idejű polimeráz láncreakció).....	24
3.4. A gerincben lévő makro- és mikroelemek analízise	25
3.5. Adatelemzés	25
4. Eredmények és értékelésük	28
4.1. A relatív génexpressziós szintek kvantitatív elemzése a vizsgált szövetekben	28
4.2. A relatív génexpresszió és a gerincoszlop elemtartalma közötti összefüggések	30
5. Következtetések és javaslatok.....	33
Összefoglalás.....	37
Irodalomjegyzék	38
Köszönetnyilvánítás.....	50

Bevezetés

Napjainkban a mezőgazdaság és az élelmiszeripar egy igen összetett kihívás előtt áll, ugyanis a világ lakosságának egészséges élelmiszerekkel történő ellátása, a népesség folyamatos növekedése és a globális klímaváltozás közepette, egyre jelentősebb probléma. Az utóbbi időben ugyan, megnövekedett az érdeklődés a részben vagy teljesen növényi alapú étrendek felé (vegetáriánus és vegán életmód), viszont a társadalom jelentősebb része továbbra is tudatosan fogyaszt állati eredetű fehérjét, illetve termékeket. Ennek köszönhetően az elmúlt évtized során az akvakultúra a világ leggyorsabban növekvő élelmiszer-termelő ágazatává válhat, ezzel nagyban hozzájárulva az élelmezésbiztonság és a megélhetés fejlesztéséhez, különösen az erőforrásokban szegény területeken. A feltörekvést az éves elemzések is alátámasztják, ugyanis becslések szerint az akvakultúra termelés 2030-ra elérheti a 109 millió tonnát, ami 32%-os növekedést jelentene a 2018-as termelési adatokhoz képest (FAO 2020).

Azonban az emberi populáció növekedése miatt ez a gyorsan fejlődő ágazat is veszélyben van, hiszen az akvakultúra olyan alapvető természeti erőforrásoktól függ, mint a víz, a talaj, a tápanyagok. Ezek az erőforrások rendkívül kitettek az ember környezet átalakító tevékenységének és a klímaváltozásnak, ami rendkívül megnehezíti a termelés fenntarthatóságát. Mivel a halhús számos szempontból könnyen beilleszthető az egészséges táplálkozásba, (laza hússzerkezet, könnyen emészthetőség, magas fehérje- és telítetlen zsírsav tartalom miatt), így a haltenyésztés során fellépő problémák megoldása egy fontos érdek az élelmezés szempontjából. Ehhez nélkülözhetetlen a legmodernebb tudományos ismeretek alkalmazása, illetve az ezekre alapozott technológiai fejlesztések végrehajtása és gyakorlása.

A felgyorsult, ipari állattenyésztés eredményeként a legtöbb intenzív ágazatban megjelentek olyan egészségügyi problémák, melyek komoly gazdasági károkat is okoznak a felmerülő állatjóléti aggályok mellett (SULLIVAN et al. 2007; EFSA 2008; FJELLDAL et al. 2012). Ilyen probléma a gerinc deformitása, ami más intenzív rendszerben tartott állatfajoknál is megjelenik, mint például a brojler csirkénél, sertéseknél és halaknál (AL-HARBI 2001). Ezen probléma a vadon élő állatok, például a homoki tigriscápa (*Carcharias taurus*), kis szájú sügér (*Micropterus dolomieu*), barnamedve (*Ursus arctos*) esetében is előfordul, és oka ott is a környezetben keresendő (VAN DEN AVYLE et al. 1989; WAGNER et al. 2005; PREZIOSI et al. 2006). Természetesen a vadon élő fajok esetén, a probléma jóval kisebb jelentőségű, mint a domesztikált állatok tartása során, mivel gazdasági hátrányokat nem okoz.

A fenntartható akvakultúra-ágazat sikere és fejlődése tehát attól is függ, hogyan kezelik ezeket a gyakori állategészségügyi problémákat, mivel a halbetegségek komoly hatással vannak a termelők gazdasági helyzetére, a termelési és beruházási veszteségekre és a fogyasztói bizalom elvesztésére is (SHEFAT és KARIM 2018). A Világbank 2006-ban arról számolt be, hogy évi 3 milliárd dolláros veszteséget számolnak az akvakultúra ágazatban a betegségek, a prevenció és egészségügyi kezelések miatt (SHEFAT és KARIM 2018). A valódi gazdasági veszteségeket nehéz megbecsülni, de az európai akvakultúra által okozott minimális éves veszteség meghaladja az 50 millió eurót évente, és feltételezhető, hogy ennek 50%-a a csontváz deformitásainak és rendellenességeinek köszönhető (BOSTOCK et al. 2016).

A deformitások különböző csontrendellenességek komplex keverékei, mely a csigolya és a gerinc alakulásának változását is érinti. Mivel a gerincoszlopot ért változások világszerte gazdasági, biológiai és állategészségügyi problémát jelentenek, így a torzulások vizsgálata a gerincdeformációk jobb megértésének segítségére lehet, és ebből kifolyólag irányt és lendületet adhat ezeknek az összetett folyamatoknak a feltárására és megértésére. A gerincdeformitás genetikai hátterének vizsgálatával elősegíthetjük a fenntartható haltenyésztést a környezetünk megóvása érdekében.

Magyarországi viszonylatban a közönséges ponty (*Cyprinus carpio* L.) rendkívüli jelentőségű, ugyanis az egyik legkeresettebb piaci halfaj, melyből az ország átlagosan 13.022 tonna mennyiséget állít elő (EUMOFA 2016). Fontos tehát a faj kutatása és a ponty termelés minőségi fejlesztése, ezért genetikai és analitikai vizsgálatunkhoz a hazai ponty állományt vettük alapul.

1. Témafelvetés

A bevezetésben leírtak alapján nem csak állatjóléti, hanem gazdasági okokból is fontos a gerincdeformált halak genetikai hátterének alaposabb megismerése. Mivel a jelenség számos tenyésztett halfajt érint már lárva és fiatalkorban is, így az akvakultúra-ágazat számára elsődleges fontosságú kutatási téma. A klímaváltozás és a túlnépesedés miatt különösen fontos a természetes erőforrásaink megőrzése, tudatos felhasználása, illetve az alternatív megoldások keresése. A halhús előállításban ilyen megoldás lehet az intenzív recirkulációs rendszerek alkalmazása, melyeknek előnye, hogy közvetlenül nem szennyeznek és igen víztakarékosak, viszont a rendszer egyik hátránya a gerincdeformitás nagy arányú előfordulása az egyedek között. Így ennek az egészségügyi problémának hosszútávon is jelentős következményei vannak az akvakultúra fenntartható fejlődésére.

Dolgozatomban normál, illetve gerincdeformált pontyokat vizsgállok, különös tekintettel a kalretikulin (calreticulin, CARL), a kollagén1-alpha-2 (collagen1-alpha-2, COL1A2), az inzulinszerű növekedési faktor 1 (insulin-like growth factor1, IGF1) és a növekedési hormon (growth hormone, GH) gének relatív expressziós szintjének meghatározására és összehasonlítására. A gének kiválasztásánál figyelembe vettük azt, hogy élettani hatásukat a vizsgált szövetekben hogyan fejtik ki. A CARL ugyanis egy autoantigén, amely gyulladás vagy bármilyen szervezetbeli változás következtében erős jelzésértékkel bír, továbbá nagy szerepe van a fehérje transzkripcióban is. A COL1A2 génre azért esett a választásunk, ugyanis megtalálható a legtöbb kötőszövetben, illetve a csigolyák fejlődését is befolyásolhatja. Az IGF1 és a GH együttes működésével szabályozza az egyedek növekedését, amely fontos alapja a halhús előállításának. A relatív génexpressziót az agy, hátizom, máj, szív és vér szövetekben vizsgáltuk. Továbbá vizsgáltam, hogy van-e különbség az egynyaras, azonos tartási és takarmányozási technológiában nevelt, normál és deformált egyedek gerincoszlopának mikro- és makro-elemtartalmában, valamint ezen eredmények összefüggést mutatnak-e a vizsgált gének relatív génexpressziójával.

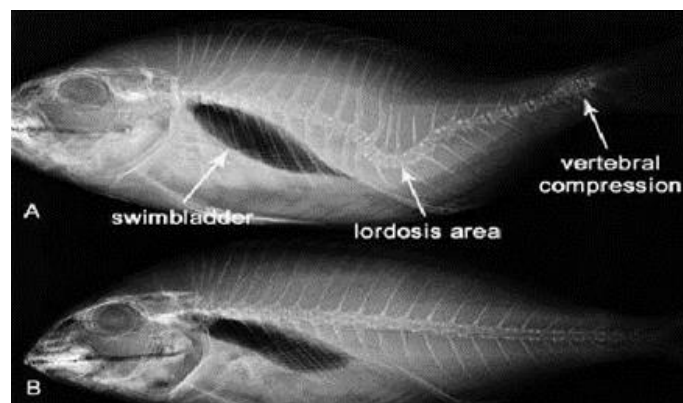
2. Irodalmi áttekintés

2.1. A gerincdeformitás

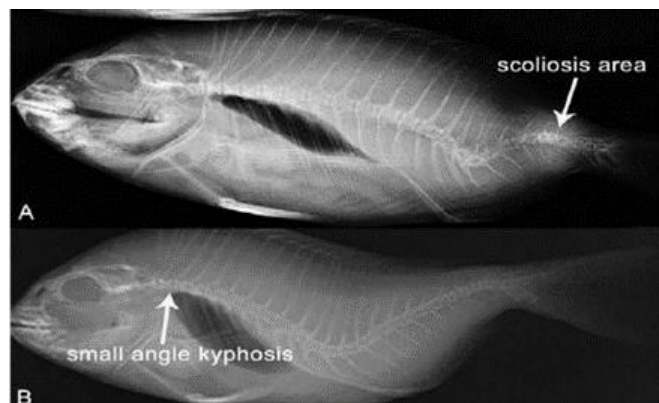
A gerincdeformitás egy olyan ismert fejlődési rendellenesség, amely a gerinc alakjának kóros mértékű elváltozásait foglalja magába (VAGSHOLM és DJUPVIK 1998). A rendellenességnek sokféle megjelenési formája lehet, mértéke változó, az enyhébb formától a súlyosabb állapotig terjedhet. Ez egy, a halak körében is megfigyelt jelenség, amely számos hátrányt jelent számukra, befolyásolhatja például a táplálkozást, a mozgást, illetve a túlélési képességeket is (SILVERSTONE és HAMMEL 2002; BOGLIONE et al. 2013). A termelés szempontjából a deformált egyedek jelentős gazdasági veszteségeket is okozhatnak, ugyanis a csökkenő testsúly és a hasított test minősége, illetve a filézési nehézségek mind a gerincdeformitás következményei (ASHLEY 2007). A probléma jelentőségét alátámasztják a számok is, ugyanis a tenyésztett atlanti lazacokban (*Salmo salar*) is gyakran fordulnak elő csigolya deformitások. Egy tanulmányban (FJELLDAL et al. 2012) például egy állomány vizuális vizsgálata és tapintása során, körülbelül 25%-uknál, a radiográfiai vizsgálatok során mintegy 70%-uknál észlelhetők voltak a szabálytalanságok. Egy másik esetben ponty (*Cyprinus carpio* L.) állományt vizsgáltak, ahol 671 egyedből 167 (24,9%) különböző deformitásokat mutatott, a 167 egyedből 18,2%-nak volt gerincdeformitása (AL-HARBI 2001).

Számos tényező játszhat szerepet a gerincdeformitás megjelenésében, például nem öröklődő veleszületett rendellenességek (BOGLIONE et al. 2013), tenyésztési és takarmányozási technikák (KASPRZAK et al. 2018), gyulladásal járó vagy fizikai traumás sérülések (ROBERTS 2012), környezeti problémák és mérgező anyagok (például a nehézfémek) (LAVADO et al. 2012; BOGLIONE et al. 2013; SFAKIANAKIS et al. 2015), továbbá paraziták (ROBERTS 2012; YOKOYAMA et al. 2005) és néhány patogén baktérium (MADSEN és DALSGAARD 1999), valamint az örökletes genetikai okok (HANSEN és PUVANENDRAN 2010). A halak gerince normál esetben a sagittális síkban egy, hátrafelé konvex „S” görbületet mutat (DE JONGE 2001). A torzulás során a hal teste a hátúszók mögött megtörik, a gerincoszlop tengelye megrövidül, ennek következtében a hal teste aránytalanul magas és tömzsi lesz, de ez nem egyezik meg a megfelelő táplálkozási viszonyok melletti normál hátíveltséggel. A gerinc ferdeségének különböző alakjai ismeretesek függőleges és vízszintes síkban egyaránt. A halaknál figyelték már meg fúziót is, ami a csigolyák összenövését jelenti (JAWAD et al. 2018; WITTEN et al. 2006). Ezen felül pedig különbséget

lehet tenni a gerincferdülés irányában, mértékében és abban is, hogy a torzulás a gerinc melyik szakaszán jelent meg (szkoliózis, lordosis és kyphosis). A lordosis a normálisnál nagyobb, befelé irányuló görbület a gerincben az ágyéki szakaszon (1. ábra). A kyphosis esetében a fokozódó természetes háti görbületet, a nyaki és ágyéki gerinc-szakasz fokozott homorulata kíséri, ez az egyfajta púposság (2. ábra). A szkoliózis pedig a gerinc oldalra való folyamatos elgörbülése (2. ábra), melynek következtében szív- és keringési zavarok, légzési nehézségek, illetve fájdalmak léphetnek fel (GJERDE et al. 2005; FJELLDAL et al. 2012; ARBUATTI et al. 2013). A halak gerincdeformitásának morfológiai leírásával már több tanulmány is foglalkozott (VAGSHOLM és DJUPVIK 1998; AL-HARBI 2001; SILVERSTONE és HAMMEL 2002; YOKOYAMA et al. 2005; JAWAD et al. 2018). A torzulás hátterében több dolog is állhat: a csigolyák anatómiailag rendellenes alakja, illetve a csigolyaíveknel a csontszövet megvastagodása (másnéven ez a hyperostosis). Ezek következtében a csigolyatest amorf alakúvá válhat, illetve a csigolyák közötti tér is csökkenhet, amik miatt a vércsatorna átmérője is csökkenhet vagy teljesen el is záródhat (JAWAD et al. 2018). Ezek a folyamatok alátámasztják azt is, hogy a torzulás következtében az egyed gerinchosszúsága csökkenhet, mely miatt az állat teste tömzsivé válhat (SILVERSTONE és HAMMEL 2002).



1. ábra: Röntgenkép a gerincdeformitás megjelenési formáiról aranydurbincsban (*Sparus aurata*) Forrás: Berillis, 2015



2. ábra: Röntgenkép a scoliosis és kyphosis megjelenéséről aranydurbincsánál (*Sparus aurata*)
Forrás: Berillis, 2015

2.2. A csigolyák fejlődése

Mivel a halak esetében a gerinc nem a testsúly hordozására szolgál, így a gerincoszlopot teljes egészében azonos erőhatások érik, ennek következtében szinte azonos felépítésű csigolyákból áll. Porcos halak esetében a csigolyák elmeszesedett porcszövetből, míg a valódi csontos halak esetében csontszövetből épülnek fel. A csontképződés alapvetően két mechanizmuson keresztül történhet mind az emlősökben, mind a valódi csontos halakban: a mezenchimális összejték, másnéven MSC-k vagy közvetlenül csontképző sejtekké, vagyis osteoblasztokká differenciálódnak (ez az intramembrán csontosodás), vagy először porcsejt -templátot képeznek, amelyet kondrociták választanak ki, amelyet később a csont fog felváltani (ez az endochondralis csontosodás) (STÉGER 2011; YTTEBORG et al. 2012). Az atlanti lazac (*Salmo salar*) esetében a csigolyákban az amphicoel csigolyák és a csontgerendák (trabeculae) kompakt csontja közvetlenül az intramembrán csontosodás révén képződik, míg a centrumot az endochondralis csontosodás modellezi (YTTEBORG et al. 2012). Mindkét csontfejlődési mechanizmus során mineralizált extracelluláris mátrix (ECM) alakul ki, amely főleg kollagénből áll, proteoglikánok és fehérjék mátrixába ágyazva, szálas elhelyezkedéssel (FRANZ-ODENDAAL et al. 2005). A csigolyaképződés során ezeknek az utaknak össze kell kapcsolódniuk és összehangoltan kell működniük (KARSENTY et al. 2009). Az osteogenesis elején expresszált számos transzkripciós faktor közül a Runx2 (Runt-related transcription factor 2) különösen fontos, mivel szükséges a csontképződéshez, így működése befolyásolhatja a sejtek csontképző képességének mértékét. A Runx2 és az Osterix downstream célpontjai közé tartoznak a kollagén (pl. 1 α és 1 β kollagén) és a nem kollagén (pl. Osteopontin, Osteocalcin, Osteonectin, Bone sialoprotein és Alp) fehérjéket kódoló gének, amelyek csontmátrix (vagyis

osteoid) előállítására és mineralizálására képesek (FRANZ-ODENDAAL et al. 2005). Az MSC-kben az osteogenesis hasznos markereiként szolgálnak: az alkalikus foszfatáz (Alp), a COL1a és az osteopontin, mely gének expressziója általában növekszik a sejtek érése során. A nem kollagén fehérjék megkötik a szervetlen ásványokat és részt vesznek az ásványosodási folyamatban (COWLES et al. 1998; FRANZ-ODENDAAL et al. 2005). A sejtek érése után az osteoblasztok elkezdenek szekretálni osteoid és mineralizáló komponenseket, ez a folyamat vezet a csont közvetlen kialakulásához az intramembrán csontosodási úton. A másik fejlődési útvonal kissé komplikáltabb, ugyanis a kondrociták szinkronizáltabb szaporodási, differenciálódási és érési folyamaton mennek keresztül, így a fejlődő porcban három kifejezett zóna azonosítható: nyugalmi, proliferáló és hipertrófiás zónák (HUNZIKER et al. 1994). A pihenő vagy nyugalmi zóna kondrocitái szabálytalanul szóródnak a porc mátrixban, míg a proliferáló és hipertrófiás zónákban lévő kondrociták oszlopokban helyezkednek el. A pihenőzóna kondrocitái stimulálják a növekedési hormont (GH) és az inzulinszerű növekedési faktort (IGF) (YTTEBORG et al. 2012). A főként kollagénből álló ECM komponensek szabályozzák a sejtek növekedését és differenciálódását a növekedési faktorokkal és enzimekkel kölcsönhatásba lépve, így biztosítva mechanikai szilárdságot és rugalmasságot a szövetnek. Az ECM -ben lévő molekulák összetétele és szerkezete kimutathatóan kulcsszerepet játszik a csontok kialakulásában, és azok változásai deformációkat okozhatnak az emlősök és a valódi csontos halak gerincében (YTTEBORG et al. 2012). A csontok mineralizációja rendkívül fontos folyamat, amit alátámaszt az is, hogy az alapvetően gyorsan növekvő atlanti lazac (*Salmo salar*) lágy, alacsony mineralizációjú csontot képez az alacsonyabb növekedési ütemű halakhoz képest (FJELLDAL et al. 2005), viszont emiatt megnőtt a csigolya deformitások kialakulásának kockázata (FJELLDAL et al. 2005; FJELLDAL et al. 2007), továbbá kimutatták, hogy egy gyorsabban növekvő állatnak az ásványi anyag bevitel nagyobb hányadát kell asszimilálnia (SUJITHA et al. 2018).

2.3. A vizsgált gének

A dolgozatomban a következő 4 gén expresszióját vizsgálom a makro és mikroelem tartalmakkal összefüggésben: kalretikulin (calreticulin, CARL), kollagén-1 alpha2 (collagen-1 alpha2, COL1A2), növekedési hormon (growth hormone, GH) és inzulinszerű növekedési faktor (insulin-like growth factor, IGF1). A 4 vizsgált génből kettő, a GH és az IGF1 gén fontos szerepet játszanak a növekedésben, illetve az élettani hatásai is szorosan összefüggnek,

továbbá egymás expressziójára is hatással vannak. Ezt a génpárt GH-IGF rendszernek, vagy GH-IGF-tengelynek is nevezzük. A nagyfokú összefüggések miatt a két gén működését egyszerre mutatom be.

Növekedési hormon (GH)

A növekedési hormon egy 191 aminosavból álló egyszerű polipeptid hormon, mely megközelítőleg 22 kDa súlyú, és a szomatotropint kódolja. A szomatolaktogenikus hormonok családjába tartozik, melynek tagja még a prolaktin, a placentáris laktogén és számos növekedési faktor is (például az IGFI, IGFII stb.). Az ebbe a fehérjecsaládba tartozó receptorok szerkezete hasonló, viszont funkciójukat tekintve igen eltérőek, ugyanis van köztük tejelválasztó, növekedést serkentő, illetve immunrendszert befolyásoló fehérje is (LE ROITH et al. 2001). Számítalan más biológiai funkciót is szabályozhatnak, részt vehetnek a reprodukcióban, az immunrendszer működésének, az ionikus és ozmotikus egyensúlynak a szabályozásában, illetve befolyásolhatják az anyagcserét is. A GH növekedést, fejlődést segítő hatású hormon, mely a csontvégek porcos részeire hat (TRIANAPHYLLOPOULOS et al. 2019). Szekvenciáját pontyban is meghatározták, mely öt exonból és négy intronból áll (CHIOU et al. 1990), mely szerkezet megegyezik az emlősök szerkezetével, viszont eltérő bizonyos halfajokhoz, mint például az atlanti lazachoz (*Salmo salar*) képest (CHIOU et al. 1990). A génről kifejeződő fehérje egy polipeptid hormon (PÉREZ-SÁNCHEZ et al. 2002; SHARMA et al. 2020), amelyet az agyalapi mirigy termel a gerincesekben (REINECKE et al. 2005). A GH termelését az agyalapi mirigyben a hipotalamusz szabályozza, a GH termelést serkentő GHRH (GH-releasing hormone) (LE ROITH et al. 2001), és gátló szomatosztatin segítségével (LE ROITH et al. 2001; SHARMA et al. 2020). Az idegrendszeren kívül más tényezők is szabályozzák a GH termelését, de ezek elsősorban a célszövetekben keletkeznek. A GH által befolyásolt faktorok megjelenése negatív visszacsatolás révén képes a GH termelés szabályozására, ilyen például az IGF is, amelynek szintézisét a GH serkenti, vagy a szabad zsírsavak, amelyek felszabadulását szintén indukálja a GH (SHARMA et al. 2020). A más GH receptorainak számára, illetve a GH szint változására hatással lehetnek a környezeti tényezők, illetve a vizsgált egyedek életkora is, továbbá ezek az értékek eltérhetnek a különböző halfajokban is (PÉREZ- SÁNCHEZ és LE BAIL 1999).

Inzulinszerű növekedési faktor (IGF)

Az IGF gén az inzulinszerű növekedési faktort (insulin-like growth factor, IGF) kódoló gén. A GH-hoz hasonlatosan szintén öt exonból és négy intronból áll (VONG et al. 2003). Az inzulinszerű növekedési faktorok (IGF-ek) létezését a szulfát porcba való beépülésének stimulálásával kapcsolatban ismerték fel. Az IGF-ek az embrionális, illetve posztnatális fejlődésben is részt vesznek, folyamatos kölcsönhatásban a GH-val. Az IGF1 élettani hatásait tekintve igen sokrétű génről van szó, ugyanis részt vesz a szövetek növekedésének és fejlődésének elősegítésében, a sejtproliferáció stimulálásában, a lipid- és szénhidrát-anyagcserére is hatással van, továbbá öregedésgátló, gyulladáscsökkentő, anabolikus, antioxidáns, ideg- és hepatoprotektív tulajdonságokkal is rendelkezik (HALMOS és SUBA 2019). Vizsgálatunk szempontjából az egyik legfontosabb tulajdonsága az, hogy az IGF1 közvetlenül növeli az izomtömeget, a csontsűrűséget és a csontok szerkezetét. Általánosságban elmondható, hogy az IGF1 túlnyomórészt a májban szintetizálódik, és fontos közvetítője a növekedési hormonhatásoknak a posztnatális élet során (VONG et al. 2003), viszont alapvetően a fehérje termelése kevésbé lokalizálható, mint a növekedési hormon esetében, tehát számtalan egyéb szövet is termel IGF-et. A mikrobiális erjesztett rostokban előállított rövid láncú zsírsavak is indukálják az IGF1 szekrécióját, ami például arra utal, hogy a mikrobiális aktivitás az IGF1-en keresztül a csontok egészségére is hatással van (HALMOS és SUBA 2019). Pontyokkal végzett vizsgálat során megállapították, hogy az izomszövet, az agy, a kopolyú, a szív, a bél, a vese és a lép szövetei is expresszálnak IGF-et, bár jóval csekélyebb mértékben, mint a máj (VONG et al. 2003). Ennek következtében a májban termelődő IGF bekerülve a vérkeringésbe endokrin módon hat, az egyéb szövetekben keletkező IGF pedig lokálisan (a vérkeringésbe nem bekerülve), autokrin vagy parakrin módon fejti ki hatását (MORIYAMA et al. 2000; LE ROITH et al. 2001). Az endokrin módon ható IGF molekulák IGF-kötő proteinekhez kapcsolódnak, amelyek carrier fehérjeként a célszövetbe szállítják a növekedési faktort, továbbá megakadályozzák a proteolitikus lebontásukat, valamint szabályozzák az IGF kapcsolódását a receptorhoz (MORIYAMA et al. 2000). Az IGF1-nek jelentős szerepe van továbbá az inzulinérzékenység alakulásában is, ugyanis közvetlen és közvetett glükózcsökkentő hatással is rendelkezik, ezáltal fokozva a szabad zsírsavak oxidációját az izomzatban, így csökkentve a szabad zsírsavak májba való áramlását, aminek következtében javítja az inzulin jelátvitelt, ami a máj glükóz kibocsátásának csökkenését eredményezi, így javítva az inzulinérzékenységet (HALMOS és SUBA 2019). Az anabolikus folyamatokat serkentve hatással van a lipid, a protein és a szénhidrát anyagcserére egyaránt. Az IGF1 a

növekedésre úgy van hatással, hogy elősegíti az izmok fejlődését a protein szintézis serkentésével az izomszövetekben, továbbá fokozza az aminosav felvételét a vázizmokba (LE ROITH et al. 2001). Ezt támasztja alá, egy egerekben végzett kísérlet, mely során azt figyelték meg, hogy a GH és a GH receptor génkiütött (knockout) egyedeknél a születési súly normális volt, azonban az IGF1 gént érintő hasonló módosításnál az egyedek születési súlya alacsonyabb volt, és későbbi növekedésük is gátolttá vált (POWELL-BRAXTON et al. 1993).

Az IGF génexpressziójának mértékét számos tanulmányban kutatták már a halak növekedésével kapcsolatosan. Vizsgálták már a környezeti tényezőkkel (McCORMICK et al. 2000; KARAKATSOULI et al. 2008; ABBINK et al. 2012), a takarmányozással (PÉREZ-SÁNCHEZ és LE BAIL 1999; BU et al. 2017), és a genetikai háttérrel összefüggésben is (VONG et al. 2013; BALOG et al. 2021). Az IGF expressziója elsősorban a GH szabályozása alatt áll, de más endokrin hormonok is befolyásolják, mint például a tiroxin hormon, melyet a pajzsmirigy termel (SCHMID et al. 2003) vagy az ösztrogén (REINECKE et al. 2005). Mérsékelt éghővi halaknál, tehát a ponty esetében is, ingadozás figyelhető meg a növekedés során a vér IGF szintjében (PÉREZ-SÁNCHEZ et al. 2002), amelyet a hőmérséklet emelkedése (BECKMAN et al. 1998) és a napok hosszának változása is serkent (McCORMICK et al. 2000). A vérben lévő IGF szintje összefügg a táplálék minőségével, az ivaréréssel, illetve a növekedéssel is (REINECKE et al. 2005). A legtöbb tanulmányban, ahol a növekedés ütemét vizsgálták, megállapították, hogy a hőmérséklet az egyik fő befolyásoló tényező. Az egyik vizsgálatban az IGF szintje minden egyedben növekedést mutatott a tavaszi időszak során (BECKMAN et al. 1998), viszont a magasabb hőmérsékletű vízben élő egyedek IGF szintje nagyobb volt az alacsonyabb hőmérsékletű vízben élő egyedekéhez képest.

GH-IGF tengely

A GH-IGF tengely az egyik legfontosabb endokrin rendszer, amely funkcionálisan és szerkezetiileg szabályozza a csontváz és a lágyrészek fejlődését, valamint a növekedéssel kapcsolatos folyamatokat. A GH-IGF gének közül csak az IGF van hatással a növekedésre embrionális korban, maga az endokrin rendszer a növekedés szabályozásában csak posztnatalisan vesz részt (LE ROITH et al. 2001). A rendszer működése serkenti a csontok hosszirányú növekedését, illetve a vázizom tömegét (LE ROITH et al. 2001). WANG és munkatársai 2001-ben pontyokkal végeztek kísérletet, mely során a GH gén bejuttatása a megtermékenyített petesejtekben fokozott mértékű növekedést eredményezett a transzgénikus

egyedekben. A GH-IGF tengelyhez és az általuk kódolt fehérje működéséhez szükségesek további proteinek is, ezek a GH és IGF receptorok, a GH-kötő fehérjék, és az IGF-kötő fehérjék (MORIYAMA et al. 2000).

Kalretikulin (CARL)

A kalretikulin egy erősen konzervált fehérje, amely elsősorban az endoplazmatikus retikulum (ER) egyik dajkafehérjéje, mely számos sejtes folyamatban vesz részt, például a nem megfelelően feltekeredett fehérjéket javítja (konformációs hajtogatás), de a sejtadhézióban is van szerepe (LIU et al. 2011). Legelőször a nyúl fajban írták le a működését (OSTWALD és MACLENNAN 1974). Emlősökben a kalretikulin egy 46 kDa-os multifunkcionális kalciumkötő fehérje, amely szerepet játszik a fehérjeszintézisben a kalretikulin/calnexin cikluson keresztül, továbbá a kalcium homeosztázis minőség-ellenőrzésében is szerepe van (MICHALAK et al. 1999), illetve a magban is megtalálható, ami arra utal, hogy szerepet játszhat a transzkripció szabályozásában, továbbá a lektinkötésben (LIU et al. 2011). A kalcium homeosztázis szabályozásán keresztül részt vehet a petesejtekérésében is.

A szervezetben a fertőzést és a gyulladást gyakran oxidatív stressz kíséri, amelyet reaktív oxigénfajok felhalmozódása okoz, ami káros lehet a szervezetre. Az antioxidáns védekező mechanizmusok és komponensek döntő fontosságúak a sejtek és szövetek károsodásának korlátozásában. Itt érdemes megemlíteni, hogy a kalretikulin egy úgynevezett autoantigén, ugyanis LIU és munkatársai 2011-ben korábbi tanulmányokban megfigyelték, hogy a kalretikulin gén erőteljesen szabályozott lett a pettyes harcsában (*Ictalurus punctatus*) Gram-negatív baktériumokkal való fertőzés után. A tanulmány célja a pettyes harcsából származó CARL gén jellemzése, genomiális szerveződésének meghatározása, a szöveti expresszió mintázatának bemutatása, valamint a harcsa lehetséges immunválaszainak megállapítása volt, *Edwardsiella ictaluri*-val való baktériumfertőzés és vaskezelés után. Az eredmények azt mutatták, hogy a harcsa genomában legalább három kalretikulinnal kapcsolatos gén található. A három CARL gén homeosztatisztikus körülmények között széles körben expresszáldott a különféle szövetekben, és expressziójuk a fertőzés és / vagy a vas szintjének változásait követően szignifikánsan emelkedett. A stresszorok ugyanis felboríthatják a sejtek metabolikus reakcióinak egyensúlyát, növelhetik a reaktív oxigénfajok (ROS) szintjét, ami még több oxidatív stresszhez és szövetkárosodáshoz, illetve a mitokondriális membrán további károsodásához vezethet (VICTOR et al. 2004), továbbá az intracelluláris vasfelhalmozódás

oxigénhiányok képződéséhez vezet (HIROYASU et al. 2002), így a sejtek vasszintjének szabályozása döntő fontosságú az oxidatív stressz válaszok közvetítésében (HIROYASU et al. 2002). A bakteriális fertőzés során a vas metabolizmusa különösen szabályozott, mivel a gazda és a kórokozó is verseng a vasraktárakért (GANZ 2003; LIU et al. 2011). A vasmegkötő fehérjék, valamint a vastranszport és a szabályozó fehérjék kettős szerepet játszhatnak mind az antioxidáns, mind az immunmoduláló válaszokban. Az endoplazmatikus retikulumból (ER) stressz hatására felszabaduló Ca^{2+} közvetítésével aktiválódik a kalretikulin.

A kalretikulin három különálló strukturális és funkcionális doménből épül fel: egy globuláris N-doménből, egy kiterjesztett P-doménből és egy savas C-doménből. Az N-domén megkötő az N-glikozilezett, éretlen és kibontakozott fehérjék cukormaradványait, megakadályozza azok Golgi-ba történő szállítását, és lehetővé teszi a konformációs hajtogató mechanizmusok működését. Az N-domén tartalmazza azokat a kettős ciszteinmaradékokat, amelyek részt vesznek a fehérje szekunder szerkezetének S – S kötéseiben. A kalretikulin N- és C-doménje között található a prolinban gazdag P-domén, amely a Ca^{2+} -ot viszonylag nagy affinitással, de alacsony kapacitással köti meg (BAKSH és MICHALAK 1991). A kalretikulin P-domén hármas ismétlődő A és B párokat tartalmaz (COE és MICHALAK et al. 2009). A kalretikulin C-doménje nagyszámú negatív töltésű maradékot tartalmaz, amelyek felelősek a fehérje Ca^{2+} puffer funkciójáért.

Kollagén1 alpha2 (COL1A2)

Az I. típusú kollagén a gerinces kötőszövet leggyakoribb extracelluláris összetevője, amelynek hármas spirálja két $\alpha 1$ és egy $\alpha 2$ láncot tartalmaz, ezt a heterotrimert emiatt a COL1A1 és COL1A2 gének kódolják. A COL1A2 megtalálható a legtöbb kötőszövetben, leginkább a szaruhártyában, a bőrben, az inakban és a csontszövetekben (melyet már a csigolyák fejlődésénél is említettem) (RIVADENEIRA et al. 2018). A gén mutációi a kötőszövetek különböző rendellenességeit okozhatják, melyek lehetnek rendkívül súlyosak, pl: osteogenesis imperfecta, vagy kevésbé súlyosak, mint például: a csonttritkulás, az Ehlers – Danlos-szindróma és az atipikus Marfan-szindróma. A leggyakoribb mutációk a glicinmaradékok szubsztitúciói, amelyek kulcsfontosságúak a kollagén hármas spiráljának kialakulásához és működéséhez (GAJKO-GALICZKA 2002). Bár az I. típusú kollagén mind a csont, mind a bőr fő szerkezeti fehérjéje, az I. típusú kollagén gének mutációi mégis csontbetegséget okozhatnak. Néhány tanulmány kimutatta, hogy a mutálódott kollagén a csontban és a bőrben másképp

expresszálódhat (GAJKO-GALICZKA 2002). Az I. típusú kollagén (amelyet a COL1A1 és COL1A2 gének írnak át) fontos az érfal rugalmasságának megőrzése miatt, illetve az extracelluláris mátrix egyik fő alkotóeleme. Az extracelluláris mátrix (ECM) komponenseinek és az ECM-bontó enzimek expressziójának modulálásával a citokinek és a növekedési faktorok szabályozzák az egyensúlyt az ECM pusztulása és a neoszintézis között, így fontos szerepet játszanak a szövetek homeosztázisának és helyreállításának szabályozásában (IKONIMIDIS et al. 2006). Köztudott, hogy a kollagén pusztulása az ér integritásának csökkenését és az ér növekedését idézheti elő, tehát az I. típusú kollagén fontos az érfal rugalmasságának fenntartásához (KAZI et al. 2003; IKONIMIDIS et al. 2006). Az emberi I. típusú kollagén $\alpha 2$ (COL1A2) génnek két dinukleotid ismétlődése van: az egyik a gén 5'-ös szegmensében található poli (dC – dA) és poli (dC – dG), míg az első intronban lévő másik a poli (dG – dT), ezek a dinukleotid ismétlések fokozó aktivitással bírnak a COL1A2 gén transzkripciójával kapcsolatban. Tanulmányok bizonyítják, hogy az ismétlés számának változása részben felelős lehet a gén transzkripció aktivitásának különbségéért (AKAI et al. 1999). Mivel az érfal állapotát erősen befolyásolja az I. típusú kollagén, így befolyásolja a szív- és érrendszeri betegségek alakulásának folyamatát is (YONEYAMA et al. 2004). Korábbi tanulmányok szerint a COL1A2 gén alapvető szerepet játszik az erek fejlődésében, stabilizálásában, érésében és átalakításában (VONTELL et al. 2006). A COL1A2 hozzájárul az I. típusú kollagén expressziójához in vivo, továbbá ez a gén fontos szerepet játszik a humán szövetek helyreállításában és fejlődésében egyaránt (PONTICOS et al. 2004). CHUNG és munkatársai 1996-ban kimutatták, hogy a transzformáló növekedési faktor- β (TGF- β) és a tumor nekrozis faktor- α (TNF- α) modulálja az I. típusú kollagén gén expresszióját a fibroblasztokban egy 25 bázispáros régióban, ami közvetíti a TGF- β felfelé szabályozó hatását a COL1A2 promoter aktivitására, és lehetővé teszi a TNF- α antagonistá aktivitását a TGF- β hatásra. A COL1A2 gén működése az érfalak rugalmasságának következtében számos kardiovaszkuláris betegség kialakulását is befolyásolhatja, például az agyvérzést, szívizominfarktust és koponyaűri aneurizmának a kialakulását is (YONEYAMA et al. 2004; LINDAHL et al. 2009).

Érdemes megemlíteni még az *Osteogenesis imperfecta* (OI), közismert nevén „üvegcsontúság” betegséget, amely egy domináns autoszomális rendellenesség, amit kötőszöveti rendellenességek és a csontok rendkívüli törékenysége jellemez. Biokémiai és molekuláris genetikai vizsgálatok kimutatták, hogy az érintettek többségében mutációk vannak jelen mind az I. típusú prokollagén láncait kódoló COL1A1, mind COL1A2 génekben (GAJKO-

GALICZKA 2002). Az OI a fenotípusok széles spektrumához kapcsolódik, az enyhe, a súlyos és a halálos állapotokig, így megkülönböztetnek 4 típust, melyet római számmal jelölnek, illetve különböztetnek meg (I-IV.) (GAJKO-GALICZKA 2002). Az enyhe formákat általában olyan mutációk okozzák, amelyek inaktiválják a COL1A1 gén egyik allélját, és csökkentett mennyiségű I. típusú kollagént eredményeznek, míg a súlyos és halálos formák a COL1A1 vagy COL1A2 domináns negatív mutációiból származnak, amelyek strukturális defektusokat okoznak a kollagén molekulában (GAJKO-GALICZKA 2002), ennek következtében mivel az ECM is főként kollagénből épül fel, így a gyenge csontfejlődés és a rossz mineralizáció következtében folyamatosan súlyosbodnak a tünetek.

2.4. A makro- és mikroelemek

A szervezet alapvető fiziológiai folyamatainak megfelelő működéséhez nélkülözhetetlenek a makro- és mikroelemek (SZABÓ 2013; AHMED et al, 2017). Az anyagcsere-folyamatokban katalizátor szerepet töltenek be. Egyes vitaminokkal ellentétben ezeket az elemeket nem lehet szintetizálni, így csak táplálékkal juthatnak be a szervezetbe. A makrotápanyagok a következők: Ca-kalcium, Cl-klór, K-kálium, Mg-magnézium, Na-nátrium, P-foszfor, és S-kén. A mikroelemek, más néven nyomelemek, a következők: Co-kobalt, Cr-króm, Cu-réz, F-fluor, Fe-vas, I-jód, Mn-mangán, Mo-molibdén, Se-szelén, Si-szilícium és Zn-cink ezek kisebb százalékban vannak jelen a szervezetben, mint a makrotápanyagok, de ugyanolyan esszenciálisak (SZABÓ 2013; PYZ-ŁUKASIK és CHAŁABIS-MAZUREK 2019). Ahogy a felsorolásból is látszik, a legtöbb mikroelem fém vagy átmeneti fém, ami azért fontos, mert a szervezetnek különbséget kell tennie a hasznos és túlzó mennyiségben káros fémek között is. A fémeket alapvetően két csoportra lehet osztani: a biológiai funkciójukat tekintve releváns és a nem releváns/ káros fémekre. A második csoportba sorolhatók pl. az alumínium (Al), a kadmium (Cd), a higany (Hg), az ón (Sn) és az ólom (Pb), ezek az úgynevezett xenobiotikumok, azaz az élő szervezetek anyagcseréjéhez nem szükséges elemek. A xenobiotikumok túlnyomó többsége – az úgynevezett inert anyagok kivételével (pl. nemesgázok), amelyek a szervezetbe jutva semmilyen hatást nem váltanak ki – károsító hatásúak (SFAKIANAKIS et al. 2015). Viszont az esszenciális fémek pl. a réz (Cu), a cink (Zn), a króm (Cr), a kobalt (Co), a molibdén (Mo) és a vas (Fe) túlzott mennyiségben szintén káros hatással lehetnek a szervezetre (MECHE et al. 2010; EL-SADAAWY et al. 2013; AHMED et al. 2017).

A hal organizmusokban a leggyakrabban előforduló nehézfémek a kadmium, az ólom, a higany, a cink, a réz, a nikkel, a kobalt, a molibdén, a króm és az ón. Ezek közül a kadmiumot, a rezet, az ólmot, a cinket, a higanyt és a krómot vizsgálták leggyakrabban a halak deformitását illetően (AHMED et al. 2017). A mérgezést okozó fémek leginkább biológiailag hozzáférhető formája az oldott ionos forma. A halakban a fémek jelentős toxicitását a fém szerves formái okozhatják, amelyek a halak számos élettani rendszerét befolyásolhatják, a toxicitás mértéke pedig csak a biológiai hozzáférhetőségtől és toxikokinetikától (felszívódás, eloszlás, biotranszformáció és kiválasztás) és a toxikodinamikától (kölsönhatások és ligandumok) (EL-SADAAWY et al. 2013) függ. A halakban a kopoltyúk és a bőr aktív szerepet játszanak az ásványi anyagok szelekciójában, ugyanis itt ürülhet ki a halakból a vér ammónia mennyiségének 90%-a és a karbamid 70%-a (SFAKIANAKIS et al. 2015). Egy tanulmány kimutatta, hogy a nehézfémek nagymértékű expozíciója rövid távon stresszreakciókat okozhat a halakban (SFAKIANAKIS et al. 2015). A vörösvérsejttrendszerben olyan adaptív változások következnek be, amelyek felkészítik a szervezetet a megnövekedett energiaköltségekre, míg a fehérvérsejt rendszerben bekövetkezett változások a stressz jelentős immunszuppresszív hatását jelzik. A tartós stresszreakciók mellett a halak fogékonyabbá válhatnak a betegségekre.

A halakban az ásványi anyagoknak is fontos szerepük van az ozmoregulációban és a vázképzésben, valamint a köztes anyagcsere folyamatokban is. Viszonylag nehéz tanulmányozni a halak megfelelő és káros ásványi szükségleteit, ugyanis egyes ásványi anyagok nagyon kis mennyiségben, más ásványi anyagok pedig jelentős mennyiségben szükségesek, amik felszívódhatnak a vízből a bőrön át, valamint a kopoltyúkon keresztül is (EL-SADAAWY et al. 2013; SFAKIANAKIS et al. 2015). A táplálkozási hibák súlyos ásványianyag -hiányhoz vezethetnek, ami a halak ellenálló képességének a csökkenéséhez vagy akár csontváz deformációjához is vezethet számos egyéb betegségen kívül (JOSEPH és RAJ 2002; KOUMOUNDOUROS et al. 2002). A mikrotápanyagok hiánya szintén veszélyes lehet, mivel nagy szükség van a metalloenzimekre (az enzimhez kötődő fémionokra), amelyek kulcsfontosságúak az immunrendszer sejtfunkcióinak fenntartásához (BLAZER 1992). Az ásványi anyagoknak a kórokozók bejutásának mértékéhez is lehet köze, ugyanis a gazdatestbe való bejutási képesség a Fe rendelkezésre állásától függ (JOSEPH és RAJ 2002), továbbá a halak fogékonyabbá válnak a fertőző kórokozókra, ha úgynevezett mikrocitás anémia, azaz vashiány lép fel a szervezetben (BLAZER 1992).

Kén

Az élettani funkciókhoz elengedhetetlen makroelem, ugyanis a szervezetek szerves és szervetlen formában is képesek felvenni (BELICZKY 2019). A kén alkotóeleme fontos aminosavaknak (például metionin, cisztein). Egyik fontos összetevője a kollagénnak, amely például az izmokban, ízületekben, porcokban, inakban, szalagokban is előfordul. Továbbá rugalmasságot kölcsönöz a keratinnak, amely a szaruképletek felépítéséért felelős fehérje, és az elasztinnak, amely a rostok, inak és szalagok proteinjének fontos alkotóeleme (HUSVETH et al. 2000; SOETAN et al. 2010; YATOO et al. 2013). Számos tanulmány vizsgálta azt, hogy a sorozatos, megfelelő vízösszetételű kénfürdők alkalmazásakor a gyulladásos és degeneratív ízületi megbetegedéseknél kimutatható az egyértelmű javulás (KOVÁCS et al. 2016). Hasznosulása az A-vitamin hiánya esetén romlik, mivel ennek következtében a szulfotranszferáz enzim aktivitása jelentősen csökken, ami gátolja a kén beépülését. Emiatt a szervezetben nagy mennyiségű kénfelesleg keletkezhet, ami enyhébb-súlyosabb toxikózisokhoz is vezethet (YATOO et al. 2013). Az emésztőtraktusban néhány mikroelemmel (Se, Cu, Mo) antagonista hatású.

Magnézium

Ez a makroelem az energiatermelő folyamatokban, illetve a sejtmembránok működésében játszik szerepet, továbbá részt vesz az izomműködésben, az ásványi anyagok csontokba való beépítésében és az ideg-izom ingerátadó folyamatokban (YATOO et al. 2013). Sokrétűségének oka abban is rejlik, hogy az anyagforgalma összefüggésben van a kalciummal és a foszforral. A szervezet magnézium-tartalmának 70%-a a csontokban, a maradék része pedig a lágy szövetekben, intracellulárisan van jelen (DUBLECZ 2011). A magnézium számos enzim például a karboxiláz és a foszforiláz aktivátora (HUSVETH et al. 2000). Hiánya súlyos problémákat okozhat, például amikor magnéziumhiányos táplálékkal etetik a fiatal csibéket, az gyenge növekedéshez és tollzáshoz, csökkent izomtónushoz, ataxiához, progresszív koordinációs zavarokhoz és görcsökhöz vezet, amit később halál követhet (YATOO et al. 2013). Az akut magnéziumhiány értágulatot is eredményezhet, továbbá a neuromuszkuláris hiperirritabilitás a folyamatos hiány következtében fokozódik, amit végül szívritmuszavar és remegés követhet (SOETAN et al. 2010).

Nátrium

A nátrium az extracelluláris tér legfontosabb elektrolitja (11). A magnéziumhoz hasonlatosan ez a makroelem is szoros összefüggésben van a káliummal és a klórral. A nátrium önmagában a folyadékháztartást befolyásolhatja, továbbá a káliummal együtt a sav- bázis egyensúly fenntartásában van fontos szerepe (HUSVETH et al. 2000). Szerepe lehet az izomműködésben, az idegrendszerben az ingerületátviteli folyamatokban, valamint az ozmotikus nyomás fenntartásában is. Hiánya az egyensúly felborulását és a szövetek fokozott vízfelvételét váltja ki, ami ezáltal duzzanatképződéshez vezet (YATOO et al. 2013).

Vas

A mikroelemek közül a vas fordul elő a legnagyobb mennyiségben a szervezetben (MIROSHNIKOVA et al. 2015). Rendkívül fontos az oxigén szállításában, ugyanis a hemoglobin és a mioglobin aktív centrumának alkotó eleme (HUSVETH et al. 2000). Vashiány esetén először a vasraktárak ürülnek ki (ugyanis a szervezet képes tárolni vasat) ezután pedig a vérképzés folyamata befolyásoltta válik, emiatt csökken a vastartalmú enzimek aktivitása és működése, végül pedig vashiányos vérszegénység alakulhat ki (MIROSHNIKOVA et al. 2015). A vaskészlet jelentős része a hemoglobinban, kisebb része pedig a májban, a lépben, a csontvelőben és az izmokban van. A vizsgált makro- és mikroelemek fontosabb jellemzőit az 1. táblázatban foglaltam össze.

1. táblázat: A dolgozatban vizsgált makro és mikroelemek fontosabb jellemzői.

Makro- és mikroelemek	Funkció	Hiánytünetek/-Kórok
Kén (S)	Aminosavak, kötőszövetek, szaruképletek, enzimek, illetve hormonok alkotóeleme.	Lassú sebgyógyulás, hegesedés, gasztro-intesztinális problémák és ízületi gyulladás
Magnézium (Mg)	Enzim kofaktorként működik, fontos funkciót tölt be a szilárd vázrendszer felépítésében, az ozmoregulációban, illetve a neuromuszkuláris átvitelben is.	Lordosis, gyenge növekedés és fehérje termelés, tetánia
Nátrium (Na)	Az izomműködésben, az idegrendszer ingerületátviteli folyamatokban, valamint az ozmotikus nyomás fenntartásában is részt vesz.	Felborulhat a folyadékháztartás és a sav- bázis egyensúly
Vas (Fe)	A hem, a citokrómok és a peroxidázok alapvető alkotóeleme.	Mikrocita hipokróm anaemia

2.5. A gerincdeformitással kapcsolatos vizsgálatok halakban

Több tanulmány vizsgálta már különböző aspektusokból a halak gerincdeformitásait, mint például a környezeti tényezők, takarmányozási hibák stb., viszont a genetikai vizsgálati módszerek fejlesztésével párhuzamosan már készültek olyan kísérletek is, melyek egyre inkább a genetikai okokkal és összefüggésekkel foglalkoznak.

EVANS-NEFF 2009-ben 50.800db királylazac (*Oncorhynchus tshawytscha*) lárván vizsgálta az additív és nem additív genetikai hatásait a keltetőházban kialakuló gerincdeformitás jelenségének. A vizsgálat alapján a szülők és az utódok közötti kapcsolat nem állt összefüggésben a gerinc deformitásával, viszont arra a következtetésre jutottak, hogy a szülői genomok kölcsönhatásai befolyásoló tényezők lehetnek beltenyésztettség esetén (EVANS-NEFF 2009). HANSEN és PUVANENDRAN 2010-ben atlanti tőkehal (*Gadus morhua*) egyedek blasztomerjeinek morfológiáját vizsgálták, azzal a céllal, hogy kiderítsék, a kórosan elváltozott blasztomerek befolyásolhatják-e az életképességet, vagy esetleg okozhatnak-e deformitásokat. Az eredmények azt mutatták, hogy a fiatalkori deformitások pozitívan korreláltak a blasztomerek elváltozásaival (HANSEN és PUVANENDRAN 2010). Ugyanebben az évben KESSABI és munkatársai (2010) zebrafogaspony (*Aphanius fasciatus*) egyedeken vizsgálta a környezeti változásra adott válaszokat a máj mRNS szintjének mérésével. A populáció egyedei sokkal nagyobb arányban mutattak gerincdeformitást, mint a vizsgálatban szereplő referenciahelyeken lévőek, ugyanis ennek a populációnak az egyedeinek szervezetében több kadmium volt mérhető.

YTTEBORG és munkatársai (2010) egy környezeti tényezővel kapcsolatosan vizsgálta a halak gerincdeformitását, viszont az eredmények alapján a genetikai összefüggésekkel magyarázták a jelenséget. Az alap koncepcióban a hipertermia káros hatásait vizsgálták, ugyanis a magas hőmérséklet fejlődési rendellenességeket idéz elő a sejtek proliferációjában, differenciálódásában és génexpressziójában, viszont az akvakultúrában a lazachús előállítása során sokszor alkalmazták ezt az eljárást a gyorsabb növekedés elérése miatt, viszont ennek következtében az intenzív termelési rendszerekben megnőtt a gerincdeformált egyedek száma. A kísérlet során a megtermékenyítéstől egészen ivadék korig magas hőmérsékleten tartották az egyedeket. Bár jelentősen gyorsabb növekedést mutattak a vizsgált egyedek, a gerincdeformáció is magasabb százalékban jelentkezett. Az eredmények azt mutatták, hogy a csigolya deformációk kialakulásának fokozott kockázata a megváltozott géntranszkripcióhoz

kapcsolódik. Különösen az ECM gének, például a COL1A1/COL1A2, az osteocalcin, az osteonectin csökkenése jelezte, hogy az osteoblastok érése és mineralizációja korlátozott, ami a nem megfelelő géntranszkripciónak köszönhető (YTTEBORG et al. 2010).

OLSVIK és munkatársai 2011-ben a higannyal (Hg) dúsított üledékek halakra gyakorolt hatásait vizsgálták egy, a második világháborúban elsüllyedt német tengeralattjáró melletti üledék mintákat használva. Fiatal atlanti tőkehal (*Gadus morhua*) egyedeket tartottak ilyen szennyezett üledékes vízben 5 hétig laboratóriumi körülmények között. A kopoltyúban és a májban bekövetkező transzkripciós válaszokat értékelték, mely során arra jutottak, hogy a halak szervezetében egyértelműen megemelkedett a Hg szint, továbbá a CARL, a HSP70 és a hem oxigenáz mRNS szintje szignifikánsan magas lett a kopoltyúban. Megállapították, hogy a természetes élőhelyeken előforduló deformításokat, illetve betegségeket nagyban befolyásolhatják az ilyen jellegű antropogén hatások.

Az elmúlt években a humánpatológia területén exponenciális érdeklődés mutatkozott olyan modellszervezetek alkalmazása iránt, amelyek alkalmasak az emlősmodellek megfelelő alternatíváira, illetve gyorsabb és olcsóbb megközelítéseket tesznek lehetővé. LAIZÉ és munkatársai 2014-ben emiatt a mára már tipikusan modellfajként emlegetett zebradánió (*Danio rerio*) és japán medaka (*Orizyas latipes*) halakon vizsgáltak egyes gyógyszerek által kiváltott oszteogén vagy oszteotoxikus hatásokat. Szintén ebben az évben CORRALES és munkatársai zebradániókat etettek benzo[a]pirént (BaP) tartalmazó takarmánnyal, aminek rákkeltő hatása ismert. Az F0 generációt 21 napig etették, majd egy F1-es generációt nevelve figyelték a hatásokat. A kísérlet végére F4 generáció lett összesen, melyből a takarmányozás és az expozíció hatására többgenerációs fenotípusos hatások jelentkeztek, ugyanis az F1-es generáció határozottan mutatott csontdeformációkat, illetve az F2-es generációban is volt, de kisebb arányban (CORRALES et al. 2014). Mivel ezek a generációk már nem voltak kitéve a BaP szennyezésnek, így a nehézfém és gyógyszermaradványok szervezetbe jutásának molekuláris útvonalaival magyarázták a jelenséget.

A halfajok termikus akklimatizációs mechanizmusaival kapcsolatos vizsgálatot végeztek ZHANG és munkatársai 2017-ben, mely során mRNS és miRNS transzkriptom szekvenálást alkalmaztak tibeti csupasz ponty (*Gymnocypris przewalskii*) lárvában. A vizsgálat során két olyan gént azonosítottak, melyek hozzájárulnak a csontváz normális fejlődéséhez. A két gén

megváltozott expressziója potenciálisan összefüggésbe hozható a deformitás és az indukált lárvapusztulás fejlődési problémáival magas hőmérsékletű vizekben (ZHANG et al. 2017).

COSTA és munkatársai 2018-ban a takarmányban lévő foszfor (P) tartalom fiziológiai hatásait vizsgálta génexpressziós módszerekkel zebradánió (*Danio rerio*) egyedekben, melynek célja a megfelelő P tartalom meghatározása volt a takarmányokban. Összesen 450 egyed szerepelt a kísérletben, a 8 hetes vizsgálat után pedig értékelték az egyedek koponya és gerinccsont deformációit. Eredményeik azt mutatták, hogy az étrendi P-koncentráció kritikus tényező volt a zebradánió csontváz rendellenességeinek előfordulásában. Az oszteokalcin expressziója fordítottan korrelált a P-szintekkel, ami a csont mineralizációs hiányának fiziológiás felépülési reakciójára utalt. Arra a következtetésre jutottak, hogy az étrendben lévő 1,55% P szignifikánsan csökkenti a csontrendszeri deformitások megjelenését és az oszteokalcin expresszió szabályozása révén elősegíti a megfelelő csont mineralizációt (COSTA et al. 2018).

2020-ban HAN és munkatársai a víz hőmérsékletének a túlélésre, a csontváz fejlődésére és a hőmérséklet által kiváltott gerincdeformitás molekuláris mechanizmusára gyakorolt hatását vizsgálták pompano (*Trachinotus ovatus*) halban. A hallárvákat kelés után 32 napig három hőmérsékletnek (26, 29, 32 °C) tették ki. A vizsgálat végén szignifikánsan nagyobb növekedési ütemet figyeltek meg a 32 °C-on tartott halakban, viszont a túlélési ráta és az RNS/DNS arány szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a 26 és 29 °C-on tartott halaknál. A legmagasabb gerincdeformitási arányt a 32 °C-on tartott halak esetében figyeltek meg, melyet azzal magyaráztak, hogy a magas hőmérséklet felfelé szabályozhatja a jelátviteli faktorok expresszióját a csontképződés során, ami így viszont alulszabályozza a sox9 expresszióját, befolyásolva az ECM-komponensek termelődését, ezáltal befolyásolva a csontok és porcok fejlődését, ami végső soron gerincdeformitásokhoz vezethet (HAN et al. 2020).

3. Anyag és módszer

3.1. Mintavétel

A kísérletbe összesen 12 pontyot vontunk be a keltetés utáni 60. napon. Ezek közül 6 egyed normál fejlődésű volt, 6 egyed pedig gerincdeformált. A 12 egyedből 6 pikkelyes, míg 6 tükrös ponty volt, így mind a normál egyedek, mind a gerincdeformitások között volt 3-3 darab mindkét fenotípusból. A halakat a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karának Halbiológiai Laboratóriumában nevelték, az egyedek ellenőrzött környezetben, azonos környezeti és takarmányozási feltételek között voltak tartva.

Az összes csoport recirkulációs rendszerben, 350 literes műanyag tartályokban volt nevelve, mechanikus biofilterrel és UV lámpával. A halakat naponta 3 alkalommal etettük (08:00, 12:00 és 16:00), kereskedelmi forgalomban lévő száraz táppal. A nem elfogyasztott takarmány és széklet naponta eltávolításra került. Az oxigén-telítettsége 80% felett, a hőmérséklet $25,05 \pm 0,5$ °C -on volt tartva. A fényperiódus 12 óra világos és 12 óra sötét volt. A víz hőmérsékletét és az oldott oxigént naponta ellenőriztük HACH HQ30d hordozható mérővel (HACH CO., Loveland, CO, USA). Az NO_2^- , NO_3^- és NH_4^+ -koncentrációkat HACH Lange DR/3900 spektrofotométerrel (HACH CO., Loveland, CO, USA) mértük.

Fontos, hogy jelen kísérletben a környezeti faktorokat, mint tényezőt kizárhattuk, hiszen az azonos környezeti feltételek között tartott egyedeknél a gerincdeformitás megjelenésének genetikai okai kerülnek előtérbe. A Halbiológiai Laboratóriumban történt a boncolás is, amely során különböző szövetekből vettünk mintákat. Dolgozatomban az agyból, vérből, szívből, májból és a hát izomszövetéből származó szövetmintákat elemzem. Boncolás előtt minden egyednek megmértük a tömegét és a testhosszát. A mintavétel 2018. július 2-án történt, ekkor az egyedek 260 naposak voltak. A boncolás előtt szegfűszegolajjal végeztünk eutanáziát az egyedeken. A mintákat RNAProtect Animal blood tubes (Qiagen, Németország) és RNA later tartalmazó csövekben tároltuk -80 °C-on feldolgozásig, az RNS stabilizálása és védelme érdekében.

3.2. RNS izolálás, cDNS átírás

A laboratóriumi munka a Debreceni Egyetem Agrár Genomikai és Biotechnológiai Központjában zajlott. Vizsgálatom során az agyból, vérből, szívből, májból és a hát

izomszövetéből származó szövetmintákból dolgoztunk, ezekből izoláltunk teljes RNS-t. RNeasy Protect Animal Blood Kitet (QIAGEN, Hilden, Németország) használtunk a vérhez, E.Z.N.A.® Total RNA Kit II-öt (Omega Bio-tek, Norcross, USA) az agyvelőhöz és az E.Z.N.A. Tissue RNA Kit-et (Omega Bio-tek, Norcross, USA) használtuk a szív, máj és hátizom szövet esetében, a folyamat során a gyártói protokollok lépéseit követtük. A minták RNS koncentrációját spektrofotométerrel (NanoDrop ND-1000) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mértük meg.

A reverz transzkriptáz enzim képes az RNS templátról DNS szálát létrehozni (FENG et al. 2012). A keletkező DNS a komplementer szál DNS-e (cDNS), és mivel már érett messenger RNS-ről keletkezett, intronokat nem tartalmaz. A vizsgálat típusától függően az adott mRNS-szintek real-time PCR-rel történő kimutatásához nincs is szükség több lépésre, mivel az egyszálú DNS ugyanúgy alkalmas a PCR-reakcióra, mint a kétszálú, csak ebben az esetben eggyel több ciklusra van szüksége ugyanakkora fluoreszcencia generálásához (FENG et al. 2012). Az átíráshoz használt szintetizáló kit a qPCR BIO cDNA Synthesis Kit (PCR Biosystems, London, Egyesült Királyság) volt.

3.3. qPCR (Valós idejű polimeráz láncreakció)

A laboratóriumi munka során fluoreszcens festékként SYBR Green I-et használtunk. A qPCR reakcióhoz a 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Egyesült Államok) készüléket alkalmaztuk. A referenciagén (HKG) a béta-2-microglobulin (B2M) gén volt.

A kiválasztott primereket a 2. táblázatban ismertetem.

2. táblázat: Az alkalmazott primerek adatai.

Gének	Primer szekvenciák (5'→3')	Amplikon hossza (bp)
β-actin2	F: CCATCGGCAATGAGCGTTTC	75
	R: GCACAGCATAAGACTCACCCA	
CALR	F: AGGCAGAACCACCTAATCAA	121
	R: CCACCTTCTCGTTGTCGATTT	
COL1A2	F: ACATTGGTGGCGCAGATCA	191
	R: ACTCCGATAGAGCCCAGCTT	

GH	F: TCTTCTCATTGTTGGGAGTGTCTCA	86
	R: AGACACCACTGTGAAATGTTCC	
IGF1	F: CGCCTCGAGATGTATTGTGCAC	73
	R: CTGTATGCCGTTGCGCTCGT	

PCR reakcióelegy 10 µl reakció közegben:

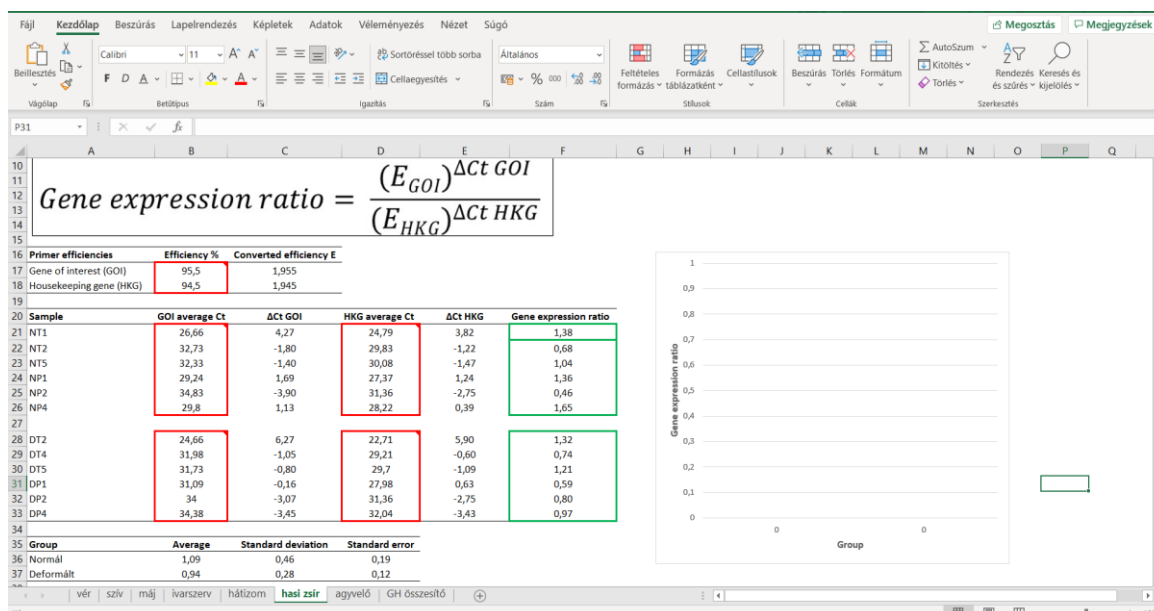
- 5 µl PowerUp™ SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)
- 0,6 µl forward primer (10µM) (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA)
- 0,6 µl reverse primer (10µM) (Millipore Sigma, Burlington, MA, USA)
- 1,3 µl dH₂O
- 2,5 µl cDNS (2 ng/µl)

3.4. A gerincben lévő makro- és mikroelemek analízise

A boncolás során a teljes gerincoszlopot is eltávolítottuk további vizsgálatok céljára. A gerincoszlopok feldolgozását a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszéken végezték el. A mintákat kemencében állandó tömegig szárították, és 2x4,0 ml salétromsavval (HNO₃) marták (p.a. 65%). Ezután 1,0 ml hidrogén-peroxidot (H₂O₂) (p.a. 30%) adtak a mintákhoz, amelyeket a mérés előtt 10 ml-re egészítettek ki. A Fe, Mg, Na, és S értékeket ezekből az oldatokból mérték egy 5110 VDV Agilent ICP-OES (Agilent, Santa Clara, USA) 5 pontos kalibrációs vonal alkalmazásával.

3.5. Adatelemzés

A Ct értékek alapján Pfaffl-módszerrel számoltuk ki a relatív génexpresszió szintjét. A módszernek köszönhetően a különböző hatékonysággal működő reakciókat is megfelelő módon lehet összehasonlítani, továbbá ez a módszer figyelembe veszi a primer hatékonysági különbségeket. A Pfaffl-módszer alkalmazásához szükség van a vizsgált gén (gene of interest, GOI) és a kontrol/referencia gén (housekeeping gene, HKG) primer hatékonysági értékére, valamint a minták ciklusküszöbértékeire (Ct), ezek segítségével kiszámolhatóak a ΔC_t értékek, majd a primer hatékonyság (E) segítségével számolhatjuk ki a gén relatív expresszió szintjét (PFAFFL 2001) (3. ábra).



3. ábra: A gének relatív expresszió szintjének számolása a Microsoft Excelben.

A Pfaffl képlet használata előtt, ki kell számolni a primer hatékonyságát (Converted primer efficiency) is, mind a GOI, mind a HKG gén esetében, melyek százalékos formában lesznek jelen a képletben. Ezt a 4. ábrán szereplő képlet segítségével lehet kiszámolni. A primer hatékonyságát a LinRegPCR 2017.0 verziójú szoftverével számítottuk ki (RAMAKERS et al. 2003).

$$\text{Primer hatékonyság} = \left(\frac{\text{Primer hatékonyság (\%)}}{100} \right) + 1$$

4. ábra: Primer hatékonyság számítás

A primer hatékonyságának kiszámolása után az átlagos Ct-értékek kiszámolása következik. Ezt követően el kell döntenünk, hogy melyik mintát vagy mintacsoportot használjuk referenciaként az összes minta ΔCt értékének kiszámításakor. Majd átlagoljuk a vizsgált és a referencia gének átlagos Ct-értékeit, ez lesz a kontroll átlag, és ΔCt értéket számolunk minden mintában minden egyes gén esetén. Ezután a kontroll átlag értékéből kivonjuk az átlagos Ct-értékeket, majd behelyettesítjük az értékeket a 5. ábrán látható egyenletbe. Az 'E' a primer hatékonyságot jelöli.

$$\text{Génexpressziós ráta} = \frac{(E_{\text{vizsgált gén}})^{\Delta C_t \text{ vizsgált gén}}}{(E_{\text{referencia gén}})^{\Delta C_t \text{ referencia gén}}}$$

5. ábra: A Pfaffl képlet (Pfaffl 2004)

A számításokhoz a Microsoft Excel 2013 (v15.0) programot használtuk. Az elemzések során a HKG, melyhez az általunk vizsgált géneket hasonlítottam, a B2M, vagyis a béta-2-mikroglobulin volt.

Minden statisztikai elemzést SPSS 26.0 szoftverrel végeztünk (IBM Corp., Armonk, New York, USA). A két csoport (normál és deformált) közötti különbségek összehasonlítására független mintás T-próbát és Mann-Whitney U-próbát használtunk. A normális eloszlást a Shapiro Wilk teszt segítségével vizsgáltuk. A szóráshomogenitást Levene tesztjével értékeltük. Ha a Levene teszt alapján a szóráshomogenitás nem volt szignifikáns, akkor független mintás T-próbát alkalmaztunk, ha pedig szignifikáns értéket kaptunk, akkor a Welch T-tesztet használtuk.

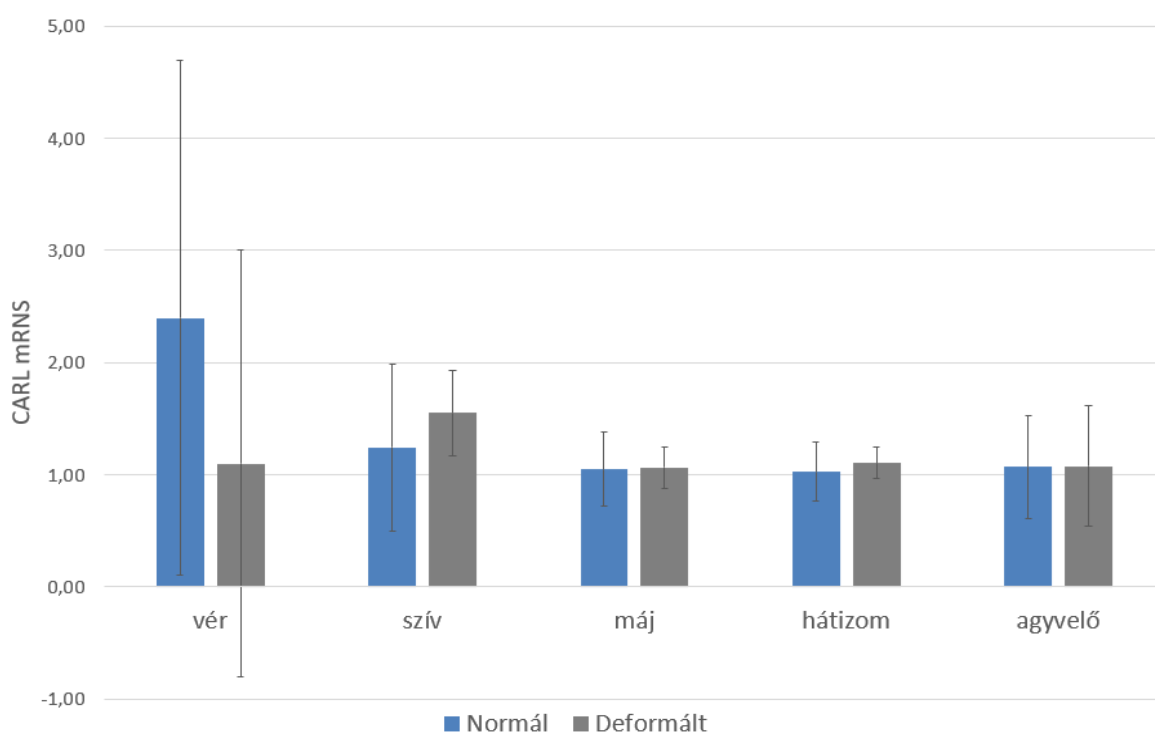
A dolgozatban lineáris regressziós modellt alkalmaztunk a génexpresszió és az elemtartalom közötti kapcsolat elemzésére a különböző szövettípusokban. Abban az esetben, amikor a vizsgált minták mRNS-expressziója vagy elemtartalma nem mutatott normális eloszlást (Shapiro-Wilk teszt esetén), akkor egy nem paraméteres statisztikai tesztet, az úgynevezett Spearman-féle rangkorrelációs tesztet használtunk a kapcsolatok elemzésére. A Spearman-féle korreláció rangsorol egy alternatív nemparaméteres módszert és a lineáris regresszió vizsgálathoz hasonlóan teljesít (STRANGER et al. 2007).

Minden statisztikai teszt/próba során $p < 0,05$ küszöbértéket alkalmaztunk a szignifikancia értékelésére.

4. Eredmények és értékelésük

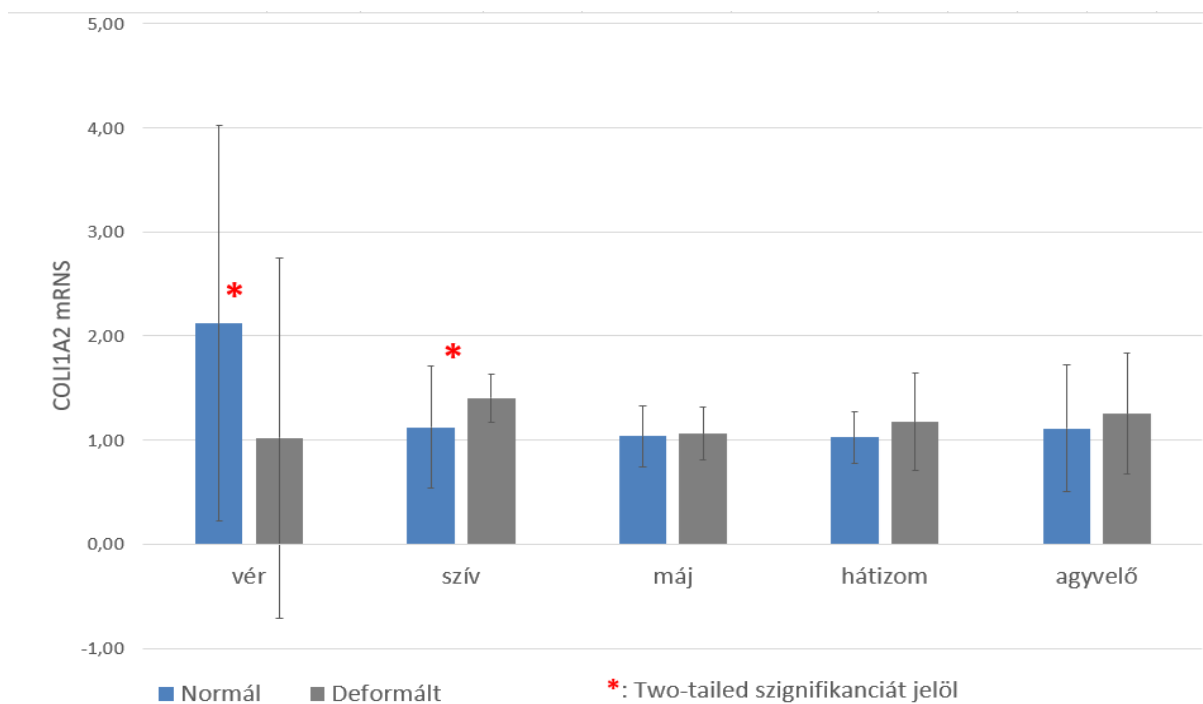
4.1. A relatív génexpressziós szintek kvantitatív elemzése a vizsgált szövetekben

A következőkben a vizsgálatba vont gének relatív expressziós vizsgálatának eredményeit ismertetem. A legnagyobb különbséget az mRNS-szintek között a CARL gén mutatta vérben, illetve az IGF az agyvelőben (6. és 9. ábra). Általánosságban elmondható, hogy ezekben az esetekben a két csoport között kiegyenlített értékeket kaptunk, kivéve a CARL expresszióját a vér esetében, ahol magasabb értéket figyeltünk meg a normál csoportban. Ez a különbség azonban statisztikailag nem volt szignifikáns.



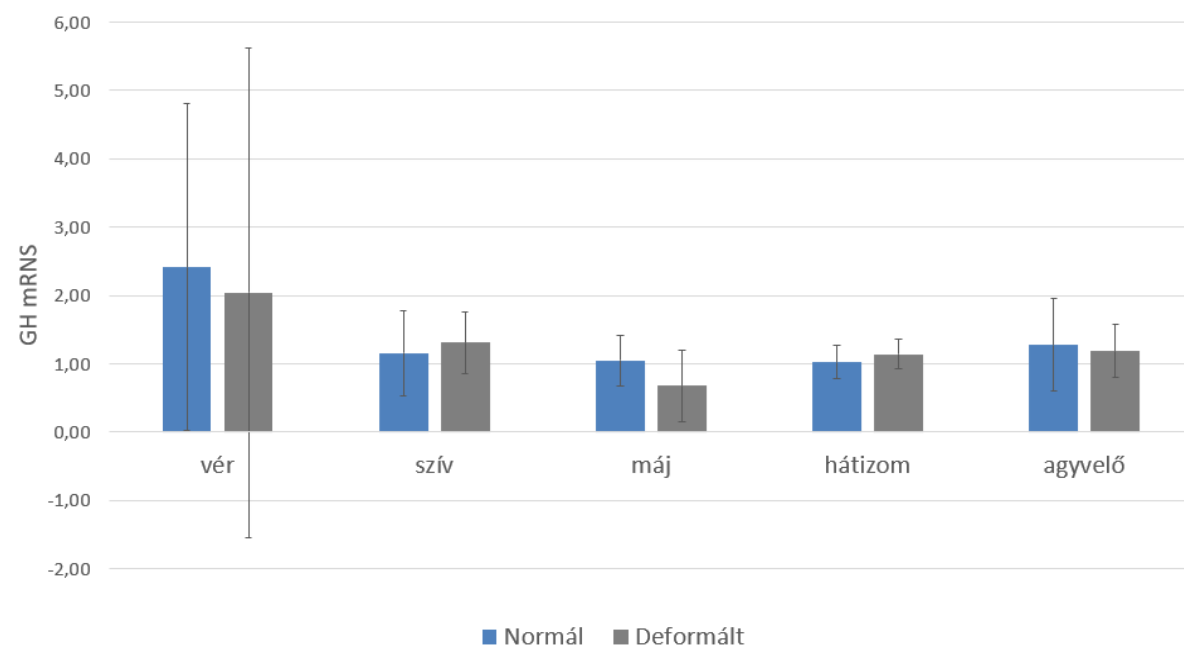
6. ábra: A CARL gén relatív expressziós szintjei a vizsgált szövetekben

A COL1A2 gén szignifikáns értéket mutatott a normál csoport vérében a deformált csoporthoz képest, illetve a deformált csoport szignifikánsan magasabb mRNS szintet mutatott a szívben (7. ábra). A két csoport között a vérben volt a legjelentősebb mértékű a relatív expressziós szintek közötti különbség.



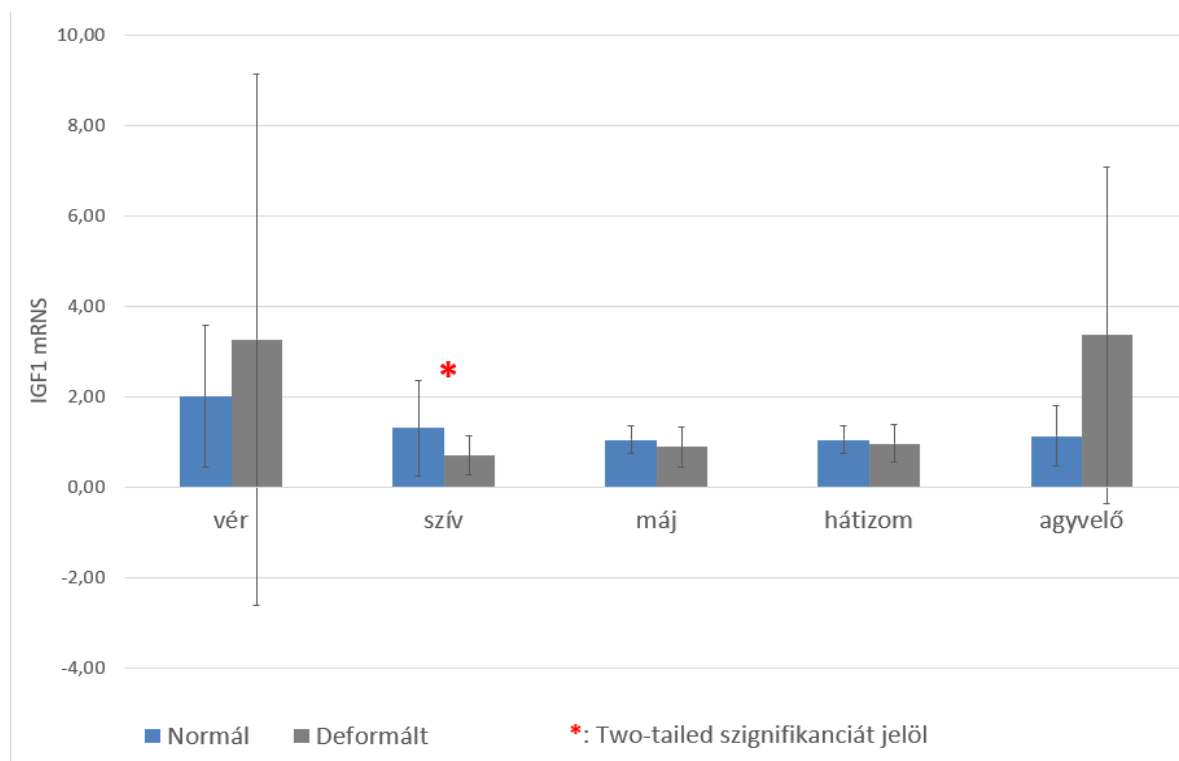
7. ábra: A COL1A2 gén relatív expressziós szintjei a vizsgált szövetekben

A GH gén relatív expressziós szintjei között nem figyeltünk meg statisztikailag szignifikáns eltérést egyik szövetben sem (8. ábra).



8. ábra: A GH gén relatív expressziós szintjei a vizsgált szövetekben

Az IGF1 expressziós szintjei esetében statisztikailag szignifikáns különbséget találtunk a szívszövetben, ahol a normál csoport magas expressziós szintet mutatott a deformált csoporthoz képest (9. ábra). A deformált csoportban bár nem szignifikáns, de jelentős különbség látható a vér és az agyvelő esetében is.



9. ábra: Az IGF1 gén relatív expressziós szintjei a vizsgált szövetekben

4.2. A relatív génexpresszió és a gerincoszlop elemtartalma közötti összefüggések

A mikro- és makroelem-tartalom elemzések során egyik vizsgált elem esetében sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget a deformált és normál csoportok között. A 3. táblázat bemutatja a lineáris regresszió és a Spearman-féle korrelációs vizsgálat szignifikáns eredményeit az mRNS szint és a makroelem-tartalmak közötti kapcsolatok vizsgálata során. A táblázatban látható, hogy több esetben kimutatható összefüggés volt az egyes gének különböző szövetekben mért relatív expressziója és a gerincoszlop ásványianyag tartalma között, továbbá minden esetben erős kapcsolat volt a változók között.

A vérben erős pozitív korreláció volt a CARL és a COL1A2 gének S és mRNS szintje között a normál csoportban (mindkét esetben $r = 0,886$; $p = 0,019$) (3. táblázat). A deformált halak szív szöveteiben a Mg-szint erős pozitív korrelációt ($r = 0,812$; $p = 0,05$) mutatott az IGF1 mRNS-

szintjével, míg ugyanezt az összefüggést erős negatív korreláció ($r = -0,829$; $p = 0,042$) jellemezte a normál csoport esetében. Alapvetően a Mg esetében erősen negatív korreláció volt a jellemző kettő vizsgált génnel a normál csoport szívszövetében (COL1A2, CARL: $= -1000$; $p = 0,000$). Ugyanakkor a S elem erős korrelációt mutat az IGF1 mRNS szintjével a szívszövetben ($r = -0,899$; $p = 0,015$). A máj Mg-tartalma erős, pozitív korrelációt mutatott a COL1A2 ($R = 0,936$; $p = 0,006$) illetve a CARL ($R = 0,904$; $p = 0,013$) génekkel a normál csoportban. A hátizom szövetben a deformált csoportban a Mg erős pozitív lineáris regressziót mutatott a GH gén mRNS-szintjével ($R = 0,838$; $p = 0,037$). Az agyban csak a Na mutatott szignifikáns lineáris regressziót, viszont ilyen kapcsolatot több gén esetében is megfigyeltünk (CARL: $R = 0,834$; $p = 0,039$; COL1A2: $R = 0,835$; $p = 0,039$; GH: $R = 0,839$; $p = 0,037$), és ez minden esetben a deformált csoportra volt jellemző.

3. táblázat: Az mRNS-szintek és a gerinc makroelem-tartalmának szignifikáns eredményei a lineáris regresszió és a Spearman-féle korreláció alapján.

Szövet	Gén	Elem	Csoport	Spearman-féle				rho	Korrelációs Együttható	p
				p	R	R ²	Korrigált R ²			
vér	CARL	S	normál					0,886		0,019
vér	COL1A2	S	normál					0,886		0,019
szív	IGF1	Mg	deformált					0,812		0,050
szív	IGF1	Mg	normál					-0,829		0,042
szív	GH	Mg	normál					0,943		0,005
szív	COL1A2	Mg	normál					-1,000		0,000
szív	CARL	Mg	normál					-1,000		0,000
szív	IGF1	S	deformált					-0,899		0,015
máj	COL1A2	Mg	normál	0,006	0,936	0,875	0,844			
máj	CARL	Mg	normál	0,013	0,904	0,817	0,771			
hátizom	GH	Mg	deformált	0,037	0,838	0,703	0,629			
agy	CARL	Na	deformált	0,039	0,834	0,696	0,620			
agy	COL1A2	Na	deformált	0,039	0,835	0,697	0,621			
agy	GH	Na	deformált	0,037	0,839	0,704	0,631			

$p \leq 0,05$

A 3. táblázat alapján elmondható, hogy a COL1A2 magasabb expressziós szintjével a normál csoportban lévő egyedek vérében a S-tartalom is nő. Erős korreláció van az IGF1 mRNS szintje és a szív Mg-tartalma között, amit a Spearman-féle korreláció is megerősített mindkét vizsgálati csoportban. Ezek alapján a deformált csoportban lévő halakat alacsonyabb IGF1 expressziós szint jellemzi, ami egy magasabb Mg szinttel társul. A deformált csoport alacsonyabb IGF1 mRNS szintjével ellentétesen negatív S-tartalom korrelációt figyeltünk meg.

4. táblázat: Az mRNS-szintek és a gerinc mikroelem-tartalmának szignifikáns eredményei a lineáris regresszió alapján.

Szövet	Gén	Mikroelem	Csoport	Lineáris Regresszió			
				p	R	R ²	Korrigált R ²
agy	CARL	Fe	deformált	0,023	0,873	0,762	0,703
agy	COL1A2	Fe	deformált	0,020	0,883	0,780	0,725
agy	GH	Fe	deformált	0,019	0,886	0,785	0,731

$p \leq 0,05$

A 4. táblázat az mRNS-szint és a mikroelem-tartalom kapcsolatának szignifikáns eredményeit mutatja be. Ebben az esetben az agyszövet mutatott egyedül kapcsolatot a génexpresszió és a Fe tartalma között néhány gén esetében. Látható, hogy minden esetben a deformált csoportban volt kimutatható az összefüggés (CARL: R = 0,873, p = 0,023, COL1A2: R = 0,883, p = 0,020, GH: R = 0,886, p = 0,019), a vizsgált Fe mikroelemmel.

5. Következtetések és javaslatok

Bár a CALR gén esetében a relatív expressziós szint nem volt szignifikánsan eltérő a vizsgált szövetek között, a vérben megfigyeltünk egy jelentősebb különbséget a csoportok között. Ennek a génnek az esetében erős negatív korreláció mutatkozott a S-tartalommal a vérben és Mg tartalommal a májban, mindkét esetben a normál csoport volt az érintett. A deformált csoportban egyedül a Na mutatott szignifikáns lineáris regressziót az agyszövetben a CALR génnel. LIU és munkatársai 2011-ben végzett vizsgálatában a CALR expressziója akkor növekedett meg jelentősen, amikor a szervezetben a fertőzés és a Fe szintje megnőtt, ugyanis ezáltal az ilyen típusú stresszorok felboríthatják a sejtek anyagsere-válaszainak egyensúlyát, melyért a CALR gén is felelős (LIU et al. 2011). YI és munkatársai 2017-ben kis dózisú ionizáló sugárzás alatt vizsgálták egerek májszöveteit, és azok reakcióját. A sugárzási dózisok növekedésével nőtt a kóros elváltozás a májszövetekben, ezzel arányosan a vizsgált fehérjék expressziója is növekedett. A vizsgálat eredményei kimutatták, hogy a CALR a besugárzott csoportokban fokozottan szabályozott volt, ami azt jelenti, hogy a CALR fontos lehet a stresszreakciókban adott válaszok esetében. Megállapították továbbá, hogy a CALR fehérje potenciális jelölt lehet egyfajta figyelmeztető biomarkernek, de a mögöttes mechanizmus további vizsgálatot igényel (YI et al. 2017). Jelenlegi ismereteink szerint a CALR nem vesz részt jelentős mértékben a gerincdeformitás kialakulásában viszont, ha már bekövetkezett a probléma, akkor nagyobb a valószínűsége annak, hogy a gén működése fokozódni fog, ezt alátámasztják a saját eredményeink is, ugyanis a deformált csoport agyszövetében a CARL gén mRNS szintje és a Fe között volt kimutatható összefüggés. Egy vizsgálatban 5 hétig magas higanytartalmú üledékben tartottak atlanti tőkehalakat (*Gadus morhua*), mely során a CALR, a HSP70 és a hem oxigenáz mRNS szintje jelentősen megnövekedett a kopoltyúknak és a májszövetben (OLSVIK et al. 2011). Az alap felvetés az volt, hogy a deformitások (különösen a csontváz deformitásai) zavarhatják a citoszelektális károsodást és az immuntoxicitást (OLSVIK et al. 2011; ZHENG et al. 2019). A higany toxicitásának elsődleges célpontjai a mitokondriumok lehetnek, aminek következtében elsősorban a sejtek fejlődése válik gátolttá (WANG et al. 2013; CHEN et al. 2017). Saját eredményeink esetében az, hogy nem volt szignifikáns eltérés a CARL gén esetében, azt jelentheti, hogy ezekre a gerincdeformált egyedekre nem hathatott stresszhatásként a deformált jelleg, vagy annak mértéke nem ért el olyan kritikus szintet, ami miatt a génnek figyelmeztető biomarker szerepe érvényre jutott volna.

Eredményeink alapján a COL1A2 gén szignifikánsan magasabb szinten expresszáldott a normál csoport vérében, mint a deformált csoportban. A gerinc S-tartalma ezzel összefüggésben erősen pozitív korrelációt mutatott. A kollagén a leggyakrabban előforduló extracelluláris mátrix fehérje (ECM), mely segít a nagyfokú terhelés elosztatásában a szövetekben (PURSLOW 2018). Az ECM degradációja izomkárosodáshoz vezethet, amelyet a myocyták szerkezeti és funkcionális változásai okoznak (STEARNS-REIDER et al. 2017). Egyes tanulmányok kimutatták, hogy a mutálódott kollagén eltérően expresszáldhat a csontban és a bőrben (GAJKO-GALICZKA 2002), például az egyik vizsgálatban egy leszabályozott COL1A2 izomsorvadást okozott a zebadánióban (*Danio rerio*), ugyanis a kollagén többek között részt vesz az ECM szerveződésének szabályozásában és a csontrendszer fejlődésében is (CHEN-CHEN et al. 2021). A COL1A2 gén alacsonyabb mRNS szintje a deformált csoport vérszövetében egy újabb jele lehet annak, hogy ez a gén kulcsszerepet játszhat a halak patológiás szerkezeti változásainak kialakulásában.

A kollagén mellett a S is fontos összetevője a szövetek erősségének, és az eredményeink arra utalnak, hogy a kollagén megfelelő expressziója a vérben közvetlen hatással lehet a szövetek kén tartalmára, így a normál sejtfejlődésre is mivel a kollagén a kénszállítás egyik fontos eleme (SOETAN et al. 2010). A COL1A2 esetében nagyon erős negatív korreláció volt a gén mRNS szintje és a gerinc Mg tartalma között a normál csoport szív szövetében. A Mg is rendkívül fontos szerepet játszik a csontszövet fejlődésében, továbbá számos enzimrendszer aktív komponense, amelyekben a timin-pirofoszfát a kofaktor. Az oxidatív foszforiláció nagymértékben csökken Mg hiányában (SOETAN et al. 2010). Ez az elem a csontok alkotóeleme is (MURRAY et al. 2000). A Mg felszívódik a belekben, majd a vér által tud eljutni a sejtekhez és szövetekhez. Vizsgálatunkban a COL1A2 szignifikánsan magasabb mRNS szintet mutatott a deformált csoport szív szövetében, ami negatívan korrelált a gerinc Mg-tartalmával. A szervezetek Mg-forgalmában részt vesz a szív, illetve a gerincoszlop csontszöve is. Ugyan a vizsgálat során összefüggést találtunk az említett útvonalon, de a folyamat pontos megértéséhez további vizsgálatok szükségesek.

A GH gén relatív expressziós szintjei között nem volt statisztikailag szignifikáns eltérés egyik szövetben sem. Az IGF1 esetében szignifikáns különbséget mértünk a két csoport mRNS szintje között a szív szövetben, ahol a deformált csoportnál volt alacsonyabb a génexpresszió mértéke. A szervezetben a vázizomzat tömege a fehérjeszintézis és a fehérjék lebomlásának sebessége

közötti egyensúlytól függ. A fehérjeszintézisben pedig az IGF génnek kulcsszerepe van (CHEN-CHEN et al. 2021). A fehérjeszintézis az intracelluláris mTOR jelátviteltől függ, amelyet az inzulin/IGF1-PI3K-Akt kaszkád foszforilációs jelei aktiválnak (PELOSI et al. 2015; O'NEILL et al. 2016). Az IGF1 receptorja az IGF1R, ami szintén részt vesz a foszforilációs jelekkel az mTOR jelátvitelben viszont, ha ezek genetikailag inaktiválódnak, akkor ennek következményeként az izomban csökkent izomrostméret vagy izomdiszplázia következhet be (AHMAD et al. 2020). A GH/IGF1 tengely szabályozza a szív növekedését, serkenti a szívizom kontraktilitását és befolyásolja az érrendszer működését. Ez alapján, ha az IGF1 működése szabályozottá válik, akkor az axonok nem tudnak rendezett módon képződni túlzott terhelés alatt vagy után, ami hozzájárulhat az izomsorvadáshoz, más néven a szívizom atrófiához. Így a deformált egyedek szívszöveteiben mért szignifikánsan alacsonyabb IGF1 expresszió szívizom atrófiára is utalhat. Ugyanakkor ez jelezheti a gerincdeformitás mértékét is, mivel a nagyfokú gerincdeformitás mellett már súlyos szív és érrendszeri problémák is jelentkeznek.

A Mg-tartalommal kapcsolatban pozitív korreláció csak a deformált halak szívszöveteiben fordult elő az IGF1 mRNS-szintjével összefüggésben, továbbá erős negatív korreláció jellemezte a normál csoportot minden másik vizsgált génnel kapcsolatosan (CARL, COL1A2, és GH). A Mg szerepe nagyon összetett, mivel számos enzim nélkülözhetetlen kofaktora, illetve fontos szerepet játszik a szilárd vázrendszer felépítésében, az ozmoregulációban és a halak neuromuszkuláris átvitelében is. Hiánya a növekedés lassulását, izomszövet degenerációt és deformálódott vázrendszert eredményez (BRUCKA-JASTRZEBSKA és KAWCZUGA 2011). Részt vesz olyan enzimek felépítésében és aktiválásában, amelyek számos fontos folyamatot katalizálnak, mint az ATP szintézis, az ATP-ADP konverzió, a fehérjeszintézis, és az oxidatív dekarboxilezés. A Mg kevésbé könnyen kerül be a vérbe, nem úgy, mint más fémek (Ni, Cd, Pb) (BRUCKA-JASTRZEBSKA és KAWCZUGA 2011). Általánosságban elmondható, hogy a gerinc Mg-tartalma erősen negatívan korrelált a legtöbb gén mRNS szintjével a normál csoport szívszöveteiben, de kivételt képeztek a GH és az IGF1 gének, ahol erős pozitív korrelációt és regressziót mértünk. A GH esetében a normál, míg az IGF1 esetében a deformált csoportban tapasztaltuk ezt az eredményt. A dolgozatban ez az egyetlen eset, amikor mindkét vizsgálati csoportban azonos összefüggésben kaptunk statisztikailag szignifikáns eredményt. Az előzőekben már említettem, hogy az izomsejtek szerkezeti károsodása a magnéziumhoz köthető. Az IGF1-koncentráció, valamint a Mg és a lipidek közötti összefüggések pedig biomarkerként használhatók a szív- és érrendszeri betegségek korai diagnosztizálására. A

cukorbetegség Mg szintje általában alacsonyabb, mivel az IGF1 képes növelni az intracelluláris Mg szintet, és megfordítani a hipertóniás sejtek tompa válaszát az inzulinra (SARKAR és MESHRAM 2018). Az IGF1 jelátvitel szabályozza a szív összehúzódását, az anyagcserét, a hipertrófiát, az autofágiát, az öregedést és az apoptózist (TRONCOSO et al. 2014). Ezek a tünetek gerincdeformitás kapcsán is megjelenhetnek, így nem férhet kétség a Mg fontos szerepéhez a kóros elváltozás kialakulásában. A szívizom a keringésen keresztül közvetetten kapcsolódik a test minden részéhez. Így az IGF1 expressziója, mint a sejtnövekedés kulcsfontosságú szabályozó génje ebben a szövetben, közvetett hatással is lehet a deformációban közvetlenül érintett szövetekre. Véleményünk szerint a mindkét csoportban kimutatott kapcsolat egymást kölcsönösen erősítő eredmény, és az ebben az összefüggésben vizsgált tényezők a genetikai okokból eredő gerincdeformitás jelenségének is kulcstényezői lehetnek. Így a szívizom, az IGF1 gén és a gerinc (vagy a szervezet más szöveteinek) Mg-tartalma további, részletesebb vizsgálatokra érdemes rendszer lehet.

A dolgozatban az egyetlen makroelem a Na, illetve az egyedülként vizsgált mikroelem, a Fe voltak azok, amik csak az agyszövettel mutattak összefüggést, három különböző génben (CALR, COL1A2, GH). A Na nélkülözhetetlen eleme az állati szervezetnek, mivel ez az elsődleges kation az extracelluláris folyadékokban (SOETAN et al. 2010). Ez a makroelem szabályozza a sav-bázis egyensúlyt, részt vesz az ozmotikus nyomás fenntartásában, aktiválja az ideg- és izomfunkciót, valamint részt vesz a Na⁺/K⁺ -ATPázban, és az idegimpulzusok átvitelében (HAYS és SWENSON 1985; MALHOTRA 2012; MURRAY et al. 2000). A Fe a hemoglobin részeként működik az oxigénszállításban (SOETAN et al. 2010), így a sejtlégzésben részt vevő enzimek nélkülözhetetlen összetevője (MALHOTRA 2012). A Fe szükséges a gerincvelő megfelelő myelinizációjához és az agyi/kisagyi redők fehérállományához (BEARD 2001). Ezek az eredmények megfelelnek az előzetes várakozásainknak, ugyanis a Na egyik legfontosabb élettani szerepe az idegimpulzusok átvitelében és a membrántranszport folyamatokban van, ezért a Na-tartalom erősen befolyásolja az agyműködést. Ezenkívül a Fe jelentős hatással van az idegrendszerre az elektrontranszportban, a neurotranszmitterek szintézisében, valamint felvételükben és a neurotranszmitterek más vastartalmú fehérjékké való lebontásában, amelyek révén közvetlenül vagy közvetve megváltoztathatják az agyműködést (BEARD 2001).

Összefoglalás

A dolgozat célja a különböző növekedéssel és idegrendszeri szabályozással kapcsolatba hozható gének relatív expressziós szintjének meghatározása volt különböző szövettípusokban normál, illetve gerincdeformált ponty egyedek csoportjaiban. Továbbá vizsgáltuk a gének mRNS expressziós szintje és a gerincoszlop makro- és mikroelem-tartalma közötti összefüggéseket is. Összességében elmondhatjuk, hogy a relatív génexpressziós szintek között 3 statisztikailag szignifikáns esetet detektáltunk, az mRNS szintek és az elemtartalom összefüggéseit vizsgálva pedig 8 esetben a normál, 9 esetben pedig a deformált csoportban tártunk fel szignifikáns különbséget. Szövet szerint csoportosítva a hátizom 1 esetben, a vérszövet 2 esetben volt érintett, legtöbbször pedig az agy és szívszövet szerepelt (6-6 eset). A makroelem-tartalom és a relatív génexpressziós szint között feltárt kapcsolatokban legtöbbször a Mg játszott szerepet. A vizsgált mikroelem esetében pedig csak a deformált csoport agyszövege volt érintett. A deformitás által közvetlenül érintett szövetben, a hátizomban, illetve a növekedés alapvető meghatározójaként szolgáló GH génben nem volt kimutatható statisztikailag szignifikáns különbség a két vizsgálati csoport között. Ez mindenesetre azt a hipotézist erősíti, hogy a gerincdeformitás kialakulása nem pusztán lokális hatásokon alapul, okai, következményei az egész szervezetre kihatnak. Emiatt a gerincdeformitást nem pusztán esztétikai hibaként kell kezelni, hanem negatív jelenséggént, amelyet állatjóléti és gazdasági okokból egyaránt meg kell akadályozni vagy csökkenteni kell.

Összefoglalva, a növekedésben és az idegrendszer szabályozásában részt vevő gének mRNS szintjei, valamint mikro- illetve makroelem szintjei viszonylag kiegyenlített arányban álltak kapcsolatban. Dolgozatom azonban csak az összefüggések feltárását célozta. A kapcsolatok irányának és pontos hátterének tisztázása további vizsgálatokat igényel a jövőben. Az mindenesetre biztosnak tűnik, hogy a jelenség hátterében egyszerre több gén és elem szabályozó szerepe is meghúzódik. Úgy gondolom, hogy a jelen eredmények alátámasztják azt az hipotézisünket, hogy a gerincdeformitás kialakulása mögött összetett jelenségek állnak, amelyek pontos feltárása holisztikus megközelítést igényel.

Bízom benne, hogy dolgozatom eredményei hozzájárulnak az intenzív recirkulációs rendszerben történő fenntartható haltenyésztés fejlődéséhez és a gerincdeformitás jelenségének visszaszorításához vagy csökkent számú és intenzitású megjelenéséhez.

Irodalomjegyzék

- ABBINK, W. – BLANCO GARCIA, A. – ROQUES, J. A. C. – PARTRIDGE, G. J. – KLOET, K. – SCHNEIDER, O. 2012: The effect of temperature and pH on the growth and physiological response of juvenile yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) in recirculating aquaculture systems. – Aquaculture 330-333: 130–135. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.11.043
- AHMAD, S. S. – AHMAD, K – LEE, E. J – LEE, Y. H – CHOI, I. 2020: Implications of Insulin-Like Growth Factor-1 in Skeletal Muscle and Various Diseases. – Cells 9(8):1773. 1–15. DOI: 10.3390/cells9081773
- AHMED, E. O. – ABD-ALRHMAN, M. AHMED – SHEHAM, J. EBRAHIM – HEBA, H. ADM. 2017: Proximate and mineral composition of some commercially important fishes in Jebel Awlia reservoir, Sudan. – International Journal of Fisheries and Aquaculture Research 3(1): 51–57. DOI: <https://doi.org/10.4314/tfb.v25i1.5>
- AL-HARBI, A. H. 2001: Skeletal Deformities in Cultured Common Carp (*Cyprinus carpio* L.) – Asian Fisheries Science 14: 247–254. DOI: <https://doi.org/10.33997/j.afs.2001.14.3.001>
- AKAI, J. – KIMURA, A. – HATA, R.-I. 1999: Transcriptional regulation of the human type I collagen $\alpha 2$ (COL1A2) gene by the combination of two dinucleotide repeats. – Gene 239(1): 65–73. DOI:10.1016/s0378-1119(99)00380-7
- ARBUATTI, A. – SALDA, L. D. – ROMANUCCI, M. 2013: Spinal deformities in a wild line of *Poecilia wingei* bred in captivity: report of cases and review of the literature. – Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 3(3): 186–190. DOI:10.1016/s2221-1691(13)60047-7
- ASHLEY, P. J. 2007: Fish welfare: Current issues in aquaculture. – Applied Animal Behaviour Science 104(3): 199–235. DOI:10.1016/j.applanim.2006.09.00
- BAKSH, S. – MICHALAK, M. 1991: Expression of calreticulin in *Escherichia coli* and identification of its Ca^{2+} binding domains. – Journal of Biological Chemistry 266(32): 21458–21465. DOI:10.1016/s0021-9258(18)54661-5
- BALOG K. – BAGI Z. – TÓTH B. – HEGEDŰS B. – FEHÉR M. – STÜNDL L. – KUSZA SZ. 2021: Association study between relative expression levels of eight genes and growth rate in Hungarian common carp (*Cyprinus carpio*) – Saudi Journal of biological sciences In press 1–10.

- BEARD, J. L. 2001: Iron biology in immune function, muscle metabolism and neuronal functioning. – *The Journal of Nutrition* 131(2): 568S–580S. DOI: 10.1093/jn/131.2.568S
- BECKMAN, B. R. – LARSEN, D. A. – MORIYAMA, S. – LEE-PAWLAK, B. – DICKHOFF, W. W. 1998: Insulin-like Growth Factor-I and Environmental Modulation of Growth during Smoltification of Spring Chinook Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). – *General and Comparative Endocrinology* 109(3): 325–335. DOI:10.1006/gcen.1997.7036
- BELICZKY G. P. 2019: Kombinált (intenzív-extenzív) harcsanevelési technológia elemeinek vizsgálata a környezeti és termelési paraméterek függvényében. Doktori értekezés. Pannon Egyetem, Georgikon Kar, Keszthely. p. 138. DOI: 10.18136/PE.2019.701
- BERILLIS, P. 2015: Factors that can lead to the development of skeletal deformities in fishes: a review. – *Journal of fisheries sciences* 9(3): 017–023.
- BLAZER, V. S. 1992: Nutrition and disease resistance in fish. – *Annual Review of Fish Diseases* 2: 309–323. DOI:10.1016/0959-8030(92)90068-9
- BOGLIONE, C. – GISBERT, E. – GAVAIA, P. – WITTEN, P. E. – MOREN, M. – FONTAGNÉ, S. – KOUMOUNDOUROS, G. 2013: Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Part 2: main typologies, occurrences and causative factors. – *Reviews in Aquaculture* 5: S121–S167. DOI:10.1111/raq.12016
- BOSTOCK, J. – LANE, A. – HOUGH, C. – YAMAMOTO, K. 2016: An assessment of the economic contribution of EU aquaculture production and the influence of policies for its sustainable development. – *Aquaculture International* 24(3): 699–733. DOI:10.1007/s10499-016-9992-1
- BRUCKA-JASTRZEBSKA, E. – KAWCZUGA, D. 2011: Level of magnesium in tissues and organs of freshwater fish. – *Journal of Elementology* 16(1): 7–20. DOI: 10.5601/jelem.2011.16.1.7-19
- BU, X. – CHEN, A. – LIAN, X. – CHEN, F. – ZHANG, Y. – BAIBING, T. – XIANPING, G. – YANG, Y. 2017: An evaluation of replacing fish meal with cottonseed meal in the diet of juvenile Ussuri catfish *Pseudobagrus ussuriensis*: Growth, antioxidant capacity, nonspecific immunity and resistance to *Aeromonas hydrophila*. – *Aquaculture* 479: 829–837. DOI:10.1016/j.aquaculture.2017.07
- CHEN, Q. L – SUN, Y. L – LIU, Z. H – LI, Y. W. 2017: Sex-dependent effects of subacute mercuric chloride exposure on histology, antioxidant status and immune-related gene

- expression in the liver of adult zebrafish (*Danio rerio*). – Chemosphere 188:1–9 DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.148
- CHIOU, C. S. – CHEN, H. T. – CHANG, W. C. 1990: The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from the common carp (*Cyprinus carpio*). – Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression 1087(1): 91–94. DOI:10.1016/0167-4781(90)90126-m
- CHUNG, K. Y. – AGARWAL, A. – UITTO, J. – MAUVIEL, A. 1996: An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2(I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor beta. – Journal of Biological Chemistry 271: 3272–3278. DOI: 10.1074/jbc.271.6.3272
- COE, H. – MICHALAK, M. 2009: Calcium binding chaperones of the endoplasmic reticulum. – General Physiology and Biophysics 28: F96–F103.
- CORRALES, J. – THORNTON, C. – WHITE, M. – WILLET, K. L. 2014: Multigenerational effects of benzo[a]pyrene exposure on survival and developmental deformities in zebrafish larvae. – Aquatic Toxicology 148: 16–26. DOI:10.1016/j.aquatox.2013.12.028
- COSTA, J. – SARTORI, M. – NASCIMENTO, N. – KADRI, S. – RIBOLLA, P. – PINHAL, D. – PEZZATO, L. 2018: Inadequate Dietary Phosphorus Levels Cause Skeletal Anomalies and Alter Osteocalcin Gene Expression in Zebrafish. – International Journal of Molecular Sciences 19(2):364–377. DOI:10.3390/ijms19020364
- COWLES, E. A. – DEROME, M. E. – PASTIZZO, G. – BRAILEY, L. L. – GRONOWICZ, G. A. 1998: Mineralization and the Expression of Matrix Proteins During In Vivo Bone Development. – Calcified Tissue International 62(1): 74–82. DOI:10.1007/s002239900397
- DE JONGE T. 2001: A gerinc sagittalis görbületi deformitásainak műtéti kezelése, különös tekintettel a scoliosishoz társuló sagittalis elváltozásokra. Doktori értekezés. Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Pécs p. 106.
- DUBLECZ K. 2011: Takarmányozástan. In: 1. fejezet. p. 1–4. Az Agrármérnöki MSc szak tananyagfejlesztése TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0010 projekt. https://dtk.tankonyvtar.hu/bitstream/handle/123456789/8640/0010_1A_Book_13_Takarmanyozastan.pdf?sequence=2&isAllowed=y
- EFSA, 2008: Scientific report on animal welfare aspects of husbandry systems for farmed Atlantic salmon. Annex I to the European Food Safety Authority Journal 736: 1–122.

- EL-SADAAWY, M. M. – EL-SAID, G. F.– SALLAM, N. A. 2013: Bioavailability of heavy metals in freshwater *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758): Potential risk to fishermen and consumers. – *Journal of Environmental Science and Health, Part B* 48(5): 402–409. DOI:10.1080/03601234.2013.742719
- EUMOFA. 2016: Price structure in the supply chain for fresh carp in Central Europe. Case study. EU Market Observatory for Fisheries and Aquaculture products.
- EVANS, M. L.– NEFF, B. D. 2009: Non-additive genetic effects contribute to larval spinal deformity in two populations of Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*). – *Aquaculture* 296(1-2): 169–173. DOI:10.1016/j.aquaculture.2009.08
- FAO. 2020: The State of World Fisheries and Aquaculture 2020. Sustainability in action. Rome. DOI: <https://doi.org/10.4060/ca9229en>
- FENG, L.– LINTULA, S. – HUU, HO. T. – ANASTASINA, M. – PAJU, A. – HAGLUND, C. – ULF-HÅKAN, S. – HOTAKAINEN, K. – ORPANA, A. – KAINOV, D. – STENMAN, J. 2012: Technique for strand-specific gene-expression analysis and monitoring of primer-independent cDNA synthesis in reverse transcription. – *BioTechniques* 52(4): 263–270. DOI:10.2144/0000113842
- FJELLDAL, P. G. – NORDGARDEN, U. – BERG, A. – GROTMOL, S. – TOTLAND, G. K. – WARGELIUS, A. – HANSEN, T. 2005: Vertebrae of the trunk and tail display different growth rates in response to photoperiod in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., post-smolts. – *Aquaculture* 250(2): 516–524. DOI:10.1016/j.aquaculture.2005.04
- FJELDALL, P. G. – HANSEN, T. J. – BERG, A. E. 2007: A radiological study on the development of vertebral deformities in cultured Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). – *Aquaculture* 273(4): 721–728. DOI:10.1016/j.aquaculture.2007.07
- FJELDALL P. G. – HANSEN T. – BRECK O. – ØRNSRUD R. – LOCK E-J. – WAAGBØ R. – WARGELIUS A. – ECKHARD W.P. 2012: Vertebral deformities in farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) – etiology and pathology. *Journal of Applied Ichthyology*. 28: 433–440. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2012.01980.x>
- FRANZ-ODENDAAL, T. A. – HALL, B. K. – WITTEN, P. E. 2005: Buried alive: How osteoblasts become osteocytes. – *Developmental Dynamics* 235(1): 176–190. DOI:10.1002/dvdy.20603

- GAJKO-GALICKA, A. 2002: Mutations in type I collagen genes resulting in osteogenesis imperfecta in humans. – Department of Medical Chemistry, Medical Academy of Białystok, Poland 49(2): 433–441. DOI:https://doi.org/10.18388/abp.2002_3802
- GJERDE, B. – PANTE, M. J. R. – BAEVERFJORD, G. 2005: Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). – Aquaculture 244: 77–87. DOI: [10.1016/j.aquaculture.2004.12.002](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.002)
- HALMOS T. – SUBA I. 2019: A növekedési hormon és az inzulinszerű növekedési faktorok élettani szerepe. – Orvosi Hetilap 160(45): 1774–1783. DOI:10.1556/650.2019.31507
- HAN, M. – LUO, M. – YANG, R. – QIN, J. G. – MA, Z. 2020: Impact of temperature on survival and spinal development of golden pompano *Trachinotus ovatus* (Linnaeus 1758). – Aquaculture Reports 18: 100556. DOI:10.1016/j.aqrep.2020.100556
- HANSEN, Ø. J. – PUVANENDRAN, V. 2010: Fertilization success and blastomere morphology as predictors of egg and juvenile quality for domesticated Atlantic cod, *Gadus morhua*, broodstock. – Aquaculture Research 41(12): 1791–1798. DOI:10.1111/j.1365-2109.2010.02506.x
- HIROYASU, M. – OZEKI, M. – MIYAGAWA-HAYASHINO, A. – FUJIWARA, Y. – HIAI, H. – TOYOKUNI, S. 2002: Novel surrogate end-point biomarker to evaluate agents for use in the chemoprevention of reactive oxygen species-associated cancer. – Redox Report 7(5): 335–338. DOI:10.1179/135100002125000938
- HUSVÉTH F. 2000: Gazdasági állatok anatómiájának és élettanának alapjai. Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 654.
- HUNZIKER, E. B. 1994: Mechanism of longitudinal bone growth and its regulation by growth plate chondrocytes. – Microscopy Research and Technique 28(6): 505–519. DOI:10.1002/jemt.1070280606
- IKONIMIDIS, J. S. – JONES, J. A. – BARBOUR, J. R. – STROUD, R. E. – CLARK, L. L. – KAPLAN, B. S. – AHMED, Z. – BAVARIA, J. E. – GORMAN, H. J. – SPINALE, F. G. – GORMAN, R. C. 2006: Expression of matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors within ascending aortic aneurysms of patients with Marfan syndrome. – Circulation 114(Suppl): I365–I370. DOI:[http:// dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000810](http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.000810)
- JAWAD, L. A. – HANSEN, T. J. – MEIER, S. – SKJAERAASEN, J. E. – FJELLDAL, P. G. 2018: Vertebral column deformity in adult wild haddock (*Melanogrammus aeglefinus*). – Journal of Fish Diseases 2018: 1–7. DOI:10.1111/jfd.12903

- JOSEPH, B. – REBELLO, A. – KULLU, P. – VIMAL, D. R. 2002: Prevalence of Malnutrition in Rural Karnataka, South India: A Comparison of Anthropometric Indicators. – *Journal of Health, Population and Nutrition* 20(3): 239–244. DOI:10.3329/JHPN.V20I3.156
- KARAKATSOULI, N. – PAPOUTSOGLOU, S. E. – PANOPOULOS, G. – PAPOUTSOGLOU, E. S. – CHADIO, S. – KALOGIANNIS, D. 2008: Effects of light spectrum on growth and stress response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* reared under recirculating system conditions. – *Aquacultural Engineering* 38: 36–42. DOI:10.1016/j.aquaeng.2007.10.006
- KARSENTY, G. – KRONENBERG, H. M. – SETTEMBRE, C. 2009: Genetic Control of Bone Formation. – *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 25(1): 629–648. DOI:10.1146/annurev.cellbio.04230
- KASPRZAK, R. – OSTASZEWSKA, T. – WAGNER, B. 2018: The effect of feeding commercial diets on the development of juvenile crucian carp (*Carassius carassius*, L.). Part 1: Skeletal deformations. – *Aquaculture Nutrition* 2018: 1–10. DOI:10.1111/anu.12831
- KAZI, M. – THYBERG, J. – RELIGA, P. – ROY, J. – ERIKSSON, P. – HEDIN, U. – SWEDENBORG, J. 2003: Influence of intraluminal thrombus on structural and cellular composition of abdominal aortic aneurysm wall. – *Journal of Vascular Surgery* 38(6): 1283–1292. DOI:10.1016/s0741-5214(03)00791-2
- KESSABI, K. – NAVARRO, A. – CASADO, M. – SAÏD, K. – MESSAOUDI, I. – PIÑA, B. 2010: Evaluation of environmental impact on natural populations of the Mediterranean killifish *Aphanius fasciatus* by quantitative RNA biomarkers. – *Marine Environmental Research* 70(3-4): 327–333. DOI:10.1016/j.marenvres.2010.06.0
- KOUMOUNDOUROS, G. – MAINGOT, E., DIVANACH, P. – KENTOURI, M. 2002: Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. – *Aquaculture* 209(1-4): 49–58. DOI:10.1016/s0044-8486(01)00821-3
- KOVÁCS C. – BOZSIK Á. – PECZE M. – BORBÉLY I. – FOGARASI A. – KOVÁCS L. – TEFNER K. I. – BENDER T. 2016: Effects of sulfur bath on hip osteoarthritis: a randomized, controlled, single-blind, follow-up trial: a pilot study. – *International Journal of Biometeorology* 60(11): 1675–1680. DOI:10.1007/s00484-016-1158-3
- LAIZÉ, V. – GAVAIA, P. J. – CANCELA, M. L. 2014: Fish: a suitable system to model human bone disorders and discover drugs with osteogenic or osteotoxic activities. – *Drug Discovery Today Disease Models* 13: 29–37. DOI: 10.1016/j.ddmod.2014.08.001

- LAVADO, R. – SHI, D. – SCHLENK, D. 2012: Effects of salinity on the toxicity and biotransformation of L-selenomethionine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos: mechanisms of oxidative stress. – *Aquatic Toxicology* 108: 18–22. DOI: 10.1016/j.aquatox.2011.07.001
- LE ROITH, D. – BONDY, C. – YAKAR, S. – LIU, J.-L. – BUTLER, A. 2001: The Somatomedin Hypothesis: 2001. – *Endocrine Reviews* 22(1): 53–74. DOI:10.1210/edrv.22.1.0419
- LINDAHL, K. – RUBIN, C.-J. – BRÄNDSTRÖM, H. – KARLSSON, M. K. – HOLMBERG, A. – OHLSSON, C. – MELLSTRÖM, D. – ORWOLL, E. – MALLMINM H. – KINDMARK, A. – LJUNGGREN, Ö. 2009: Heterozygosity for a coding SNP in COL1A2 confers a lower BMD and an increased stroke risk. – *Biochemical and Biophysical Research Communications* 384(4): 501–505. DOI:10.1016/j.bbrc.2009.05.006
- LIU, H. – PEATMAN, E. – WANG, W. – ABERNATHY, J. – LIU, S. – KUCUKTAS, H. – JIANGUO, L. – DE-HAI, X. – KLESIOUS, P. – WALDBIESER, G. – Liu, Z. 2011: Molecular responses of calreticulin genes to iron overload and bacterial challenge in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). – *Developmental & Comparative Immunology* 35(3): 267–272. DOI:10.1016/j.dci.2010.11.009
- MADSEN, L. – DALSGAARD, I. 1999: Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). – *Aquaculture* 171(1-2): 41–48. DOI:10.1016/S0044-8486(98)00427-X
- MALHOTRA, V. K. (2012): *Biochemistry for Students*. 12th edition – New Delhi, India, Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd. p. 418.
- McCORMICK, S. D. – MORIYAMA, S. – BJÖRNSSON, B. T. 2000: Low temperature limits photoperiod control of smolting in Atlantic salmon through endocrine mechanisms. – *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 278(5): R1352–R1361. DOI:10.1152/ajpregu.2000.278.5.r1
- MECHE, A. – MARTINS, M. C. – LOFRANO, B. E. S. N. – HARDAWAY, C. J. – MERCHANT, M. – VERDADE, L. 2010: Determination of heavy metals by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry in fish from the Piracicaba River in Southern Brazil. – *Microchemical Journal* 94(2): 171–174. DOI:10.1016/j.microc.2009.10.018

- MICHALAK, M. – CORBETT, E. F. – MESAELI, N. – NAKAMURA, K. – OPAS, M. 1999: Calreticulin: one protein, one gene, many functions. – *Biochemical Journal* 344(2): 281–292. DOI:10.1042/bj3440281
- MIROSHNIKOVA, E. – ARINZHANOV, A. – KILYAKOVA, Y. – SIZOVA, E. – MIROSHNIKOV, S. 2015: Antagonist metal alloy nanoparticles of iron and cobalt: impact on trace element metabolism in carp and chicken. – *Human & Veterinary Medicine International Journal of the Bioflux Society* 7(4): 253–259.
- MORIYAMA, S. – AYSON, F. G. – KAWAUCHI, H. 2000: Growth Regulation by Insulin-like Growth Factor-I in Fish. – *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 64(8): 1553–1562. DOI:10.1271/bbb.64.1553
- MURRAY, RK. – GRANNER, DK. – MAYES, PA. – RODWELL, VW. (2000): Harper's Biochemistry, 25th edition – McGraw-Hill: Health Profession Division, 225 pp.
- OLSVIK, P. A. – BRATTÅS, M. – LIE, K. K. – GOKSØYR, A. 2011: Transcriptional responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) after exposure to mercury-contaminated sediments obtained near the wreck of the German WW2 submarine U-864, and from Bergen Harbor, Western Norway. – *Chemosphere* 83(4): 552–563. DOI:10.1016/j.chemosphere.2010.12
- OSTWALD, T. J. – MACLENNAN, D. H. 1974: Isolation of a high affinity calcium-binding protein from sarcoplasmic reticulum. – *Journal of Biological Chemistry* 249: 974–979. DOI:10.1016/S0021-9258(19)43026-3
- PÉREZ-SÁNCHEZ, J. – LE BAIL, P.-Y. 1999: Growth hormone axis as marker of nutritional status and growth performance in fish. – *Aquaculture* 177(1-4): 117–128. DOI:10.1016/s0044-8486(99)00073-3
- PÉREZ-SÁNCHEZ, J.A. – CALDUCH-GINER, M. – MINGARRO, S. – VEGA-RUBÍN, D. C. P. – GÓMEZ-REQUENI, A. – SAERA-VILA, A. – ASTOLA, M.M. VALDIVIA, 2002: Overview of Fish Growth Hormone Family. New Insights in Genomic Organization and Heterogeneity of Growth Hormone Receptors. – *Fish Physiology and Biochemistry* 27: 243–258 DOI:10.1023/b:fish.0000032729.72746.c8
- PFAFFL, M. W. 2001: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. – *Nucleic Acids Research* 29(9): 45e–45. DOI:10.1093/nar/29.9.e45
- POWELL-BRAXTON, L.– HOLLINGSHEAD, P. – WARBURTON, C. – DOWD, M.– PITTS-MEEK, S. – DALTON, D. – GILLETT, N. – STEWART, T. A. 1993: IGF-I is

- required for normal embryonic growth in mice. – *Genes & Development* 7(12b): 2609–2617. DOI:10.1101/gad.7.12b.2609
- PONTICOS, M. – PARTRIDGE, T. – BLACK, C. M. – ABRAHAM, D. J. – BOU-GHARIOS, G. 2004: Regulation of Collagen Type I in Vascular Smooth Muscle Cells by Competition between Nkx2.5 and EF1/ZEB1. – *Molecular and Cellular Biology* 24(14): 6151–6161. DOI:10.1128/mcb.24.14.6151-6161.2004
- PREZIOSI, R. – GRIDELLI, S. – BORGHETTI, P. – DIANA, A. – PARMEGGIANI, A. FIORAVANTI, M. L. 2006: Spinal deformity in a sandtiger shark, *Carcharias taurus* Rafinesque: a clinical-pathological study. – *Journal of Fish Diseases* 29: 49–60. DOI: 10.1111/j.1365-2761.2005.00684.x
- PYZ-ŁUKASIK, R. – CHAŁABIS-MAZUREK, A. 2019: Content of macro- and microelements in the muscles of grass carp, bighead carp, Siberian sturgeon and wels catfish from eastern Poland. – *Journal of Elementology* 24(1): 221–232. DOI: 10.5601/jelem.2018.23.2.1656
- RAMAKERS, C. – RUIJTER, J.M. – DEPREZ, R.H. – MOORMAN, A.F. 2003: Assumption-free analysis of quantitative real-time PCR data. – *Neuroscience Letter* 339: 62–66. DOI: 10.1016/s0304-3940(02)01423-4
- REINECKE, M. – BJÖRNSSON, B. T. – DICKHOFF, W. W. – MCCORMICK, S. D. – NAVARRO, I. – POWER, D. M. – GUTIÉRREZ, J. 2005: Growth hormone and insulin-like growth factors in fish: Where we are and where to go. – *General and Comparative Endocrinology* 142(2): 20–24. DOI:10.1016/j.ygcen.2005.01.016
- RIVADENEIRA, F. – UITTERLINDEN, A. G. 2018: Osteoporosis Genes Identified by Genome-Wide Association Studies. – *Genetics of Bone Biology and Skeletal Disease* 377–395. DOI:10.1016/b978-0-12-804182-6.00022-8
- ROBERTS R. J. (2012): *Fish Pathology*. Fourth Edition. Blackwell Publishing Ltd. In: 292–339. p. 591.
- SARKAR, S. – MESHRAM, A. 2018: IGF-1 Level In Type II Diabetics And Its Association With Serum Magnesium Level In The Rural Region of Vidarbha, Maharashtra, India. – *International Journal of Recent Scientific Research* 9(5): 26625–26631. DOI: <http://dx.doi.org/10.24327/ijrsr.2018.0905.2094>
- SCHMID, A. C. – LUTZ, I. – KLOAS, W. – REINECKE, M. 2003: Thyroid hormone stimulates hepatic IGF-I mRNA expression in a bony fish, the tilapia *Oreochromis*

- mossambicus*, in vitro and in vivo. – General and Comparative Endocrinology 130(2): 129–134. DOI:10.1016/s0016-6480(02)00577-4
- SFAKIANAKIS, D. G. – RENIERI, E. – KENTORURI, M. – TSATSAKIS, A. M. 2015: Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. – Environmental Research 137: 246–255. DOI:10.1016/j.envres.2014.12.014
- SHARMA, R. – KOPCHICK, J. J. – PURI, V. – SHARMA, V. M. 2020: Effect of growth hormone on insulin signaling. – Molecular and Cellular Endocrinology 518:111038. 1–12. DOI:10.1016/j.mce.2020.111038
- SHEFAT, S. H. T. – KARIM, M. D. A. 2018: “Nutritional Diseases of Fish in Aquaculture and Their Management: A Review”. – Acta Scientific Pharmaceutical Sciences 2(12): 50–58.
- SILVERSTONE, A. M. – HAMMELL, L. 2002: Spinal deformities in farmed Atlantic salmon. – Canadian Veterinary Journal 43: 782–784.
- SOETAN, K. O. – OLAIYA C. O. – OYEWOLE, O. E. 2010: The importance of mineral elements for humans, domestic animals and plants A review. – African Journal of Food Science 4(5): 200–222. DOI: 10.5897/AJFS.9000287
- SUJITHA, S. B. – JONATHAN, M. P. – AURIOLES-GAMBOA, D. – CAMPOS VILLEGAS, L. E. – BOHÓRQUEZ-HERRERA, J. – HERNÁNDEZ-CAMACHO, C. J. 2018: Trace elements in marine organisms of Magdalena Bay, Pacific Coast of Mexico: Bioaccumulation in a pristine environment. – Environmental Geochemistry and Health 1–15. DOI:10.1007/s10653-018-0198-5
- SULLIVAN, M. – GUY, D. R. – ROBERTS, R. J. – MANCHESTER, N. J. 2007: The aetiology of spinal deformity in Atlantic salmon, *Salmo salar* L.: influence of genetic factors on the frequency and severity in freshwater stages. – Journal of Fish Diseases 30: 753–758. DOI: [10.1111/j.1365-2761.2007.00888.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2007.00888.x)
- STÉGER V. 2011: A gímszarvas csontsűrűség változásáért felelős gének azonosítása az agancsiklus alatt. – Doktori (PhD) értekezés. Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar Biológiai Intézet Genetikai Tanszék. p. 129.
- STRANGER, B. E. – NICA, A. C. – FORREST, M. S. – DIMAS, A. – BIRD, C. P. – BEAZLEY, C. – INGLE, C. E. – DUNNING, M. – FLICEK, P. – KOLLER, D. – MONTGOMERY, S. – TAVARE, S. – DERMITZAKIS, E. T. 2007: Population genomics of human gene expression. – Nature genetics 39(10): 1217–1224. DOI: [10.1038/ng2142](https://doi.org/10.1038/ng2142)

- SZABÓ S. A. 2013: Mikroelemek esszencialitása és az élelmiszervizsgálat. BCE, Élelmiszer-tudományi Kar, Élelmiszerfizika Közhasznú Alapítvány 2013. április 17. p. 11.
- TRIANANTAPHYLLOPOULOS, K. A. – CARTAS, D. – MILIOU, H. 2019: Factors influencing GH and IGF-I gene expression on growth in teleost fish: how can aquaculture industry benefit? – *Reviews in Aquaculture* 1–26. DOI:10.1111/raq.12402
- TRONCOSO, R. – IBARRA, C. – VICENCIO, J. M. – JAIMOVICH, E. – LAVANDERO, S. 2014: New insights into IGF-1 signaling in the heart. – *Trends in Endocrinology & Metabolism* 25(3): 128–137. DOI: 10.1016/j.tem.2013.12.002
- VAGSHOLM, I. – DJUPVIK, H. O. 1998: Risk factors for spinal deformities in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. – *Journal of Fish Diseases* 21(1): 47–53. DOI:10.1046/j.1365-2761.1998.00069.x
- VAN DEN AVYLE, M. J. – GARVICK, S. J. – BLAZER, V. S. – HAMILTON, S. J. – BRUMBAUGH, W. G. 1989: Skeletal Deformities in Smallmouth Bass, *Micropterus Dolomieu*, from Southern Appalachian Reservoirs. – *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18: 688–696. DOI:10.1007/BF01225007
- VICTOR, V. M. – ROCHA, M. – DE LA FUENTE, M. 2004: Immune cells: free radicals and antioxidants in sepsis. – *International Immunopharmacology* 4(3): 327–347. DOI:10.1016/j.intimp.2004.01.020
- VONG, Q. P. – CHAN, K. M. – CHENG, C. H. K. 2003: Quantification of common carp (*Cyprinus carpio*) IGF-I and IGF-II mRNA by real-time PCR: differential regulation of expression by GH. – *Journal of Endocrinology* 178(3): 513–521. DOI:10.1677/joe.0.1780513
- VONTELL, D. – ARMULIK, A. – BETSHOLTZ, C. 2006: Pericytes and vascular stability. – *Experimental Cell Research* 312(5): 623–629. DOI:10.1016/j.yexcr.2005.10.019
- WAGNER, W. M. – HARTLEY, M. P. – DUNCAN, N. M. – BARROWS, M. G. 2005: Spinal spondylosis and acute intervertebral disc prolapse in a European brown bear (*Ursus arctos arctos*). – *Journal of the South African Veterinary Association* 76: 120–122. DOI:10.4102/jsava.v76i2.410
- WANG, Y. – HU, W. – WU, G. – SUN, Y. – CHEN, S. – ZHANG, F. – ZHU, Z. – FENG, J. – ZHANG, X. 2001: Genetic analysis of “all-fish” growth hormone gene transferred carp (*Cyprinus carpio* L.) and its F1 generation. – *Chinese Science Bulletin* 46(14): 1–4. DOI:10.1007/bf02900596

- WANG, M. H. – WANG, Y. Y. – ZHANG, L. – WANG, J. – HONG, H. S. – WANG, D. Z. 2013: Quantitative proteomic analysis reveals the mode-of-action for chronic mercury hepatotoxicity to marine medaka (*Oryzias melastigma*). – *Aquatic Toxicology* 130–131. DOI:[10.1016/j.aquatox.2013.01.012](https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.01.012)
- WITTEN, P. E. – OBACH, A. – HUYSSEUNE, A. – BAEVERFJORD, G. 2006: Vertebrae fusion in Atlantic salmon (*Salmo salar*): Development, aggravation and pathways of containment. – *Aquaculture* 258(1-4): 164–172. DOI:[10.1016/j.aquaculture.2006.0](https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2006.0)
- YATOO, MI. – SAXENA, A. – DEEPA, PM. – HABEAB, B. P. – DEVI, S. – JATAV, R. S. – DIMRI, U. 2013: Role of Trace elements in animals: a review. – *Veterinary World* 6(12): 963–967.
- YI, L. – HU, N. – YIN, J. – SUN, J. – MU, H. – DAI, K. – DING, D. 2017: Up-regulation of calreticulin in mouse liver tissues after long-term irradiation with low-dose-rate gamma rays. – *PLOS ONE* 12(9): 1–14. e0182671. DOI:[10.1371/journal.pone.0182671](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182671)
- YOKOYAMA, H. – FREEMAN, M. – ITOH, N. – FUKUDA, Y. 2005: Spinal curvature of cultured Japanese mackerel (*Scomber japonicus*) associated with a brain myxosporean, *Myxobolus acanthogobii*. – *Diseases of Aquatic Organisms* 66: 1–7. DOI:[10.3354/dao066001](https://doi.org/10.3354/dao066001)
- YONEYAMA, T. – KASUYA, H. – ONDA, H. – AKAGAWA, H. – HASHIGUCHI, K. – NAKAJIMA, T. – HORI, T. – INOUE, I. 2004: Collagen type I alpha2 (COL1A2) is the susceptible gene for intracranial aneurysms. – *Stroke* 35(2): 443–448. DOI:[10.1161/01.STR.0000110788.45858.DC](https://doi.org/10.1161/01.STR.0000110788.45858.DC)
- YTTEBORG, E. – BAEVERFJORD, G. – TORGERSEN, J. – HJELDE, K. – TAKLE, H. 2010: Molecular pathology of vertebral deformities in hyperthermic Atlantic salmon (*Salmo salar*). – *BMC Physiology* 10(1): 1–16. DOI:[10.1186/1472-6793-10-12](https://doi.org/10.1186/1472-6793-10-12)
- YTTEBORG, E. – TORGERSEN, J. – BAEVERFJORD, G. – TAKLE, H. 2012: The Atlantic Salmon (*Salmo salar*) Vertebra and Cellular Pathways to Vertebral Deformities. – *Health and Environment in Aquaculture* 329–358. DOI:[10.5772/30750](https://doi.org/10.5772/30750)
- ZHANG, C. – TONG, C. – TIAN, F. – ZHAO, K. 2017: Integrated mRNA and microRNA transcriptome analyses reveal regulation of thermal acclimation in *Gymnocypris przewalskii*: A case study in Tibetan Schizothoracine fish. – *PLOS ONE* 12(10): e0186433. DOI:[10.1371/journal.pone.0186433](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186433)

ZHENG, N. – WANG, S. – DONG, W. – HUA, X. – LI, Y. – SONG, X. – CHU, Q. – LI, Y.
2019: The Toxicological Effects of Mercury Exposure in Marine Fish. – Bulletin of
Environmental Contamination and Toxicology 1–7. DOI:10.1007/s00128-019-02593-2

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Kusza Szilvia témavezetőmnek, hogy értékes, minőségi és sokoldalú szakmai segítséget nyújtott és hogy biztosította a kutatás feltételeit.

Köszönettel tartozom továbbá másik témavezetőmnek, Dr. Bagi Zoltánnak is, türelméért és hogy a lehető legnagyobb segítségemre volt a kutatás összes részében és a dolgozat megírásában egyaránt.

Köszönöm a DE-MÉK Halbiológiai Laboratóriumnak a ponty minták rendelkezésemre bocsátását.

Köszönöm a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémiai Tanszéknek a gerincoszlopok elemtartalmának meghatározásában nyújtott analitikai segítséget.

Köszönöm a Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar/ Agrár Genomikai és Állatgenetikai Kutatóközpontnak, hogy lehetővé tette számomra a laboreszközök használatát.

A munka a GINOP-2.3.2-15-2016-00025 projekt keretei között az Európai Regionális és Fejlesztési Alap és Magyarország Kormánya támogatásával valósult meg.

Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-21-2 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.



NEMZETI KUTATÁSI, FEJLESZTÉSI
ÉS INNOVÁCIÓS HIVATAL