

Diplomamunka

Józsa Em ke

2019

Állatorvostudományi Egyetem
Magyar Tudományos Akadémia Agrártudományi
Kutatóközpont Állatorvos-tudományi Intézet

**Intenzíven tenyésztett tokfélék feltételezetten virális eredetű
daganatai**

Készítette: Józsa Emőke

Témavezetők:

Borzák Réka, biológus, PhD hallgató, MTA ATK ÁOTI Halkórtan és
parazitológia munkacsoport, tudományos segédmunkatárs
Dr. Baska Ferenc, Állatorvostudományi Egyetem, Egzotikusállat- és
Vadegészségügyi Tanszék, egyetemi docens

Budapest, 2018

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék.....	2
Rövidítések jegyzéke.....	4
1 Bevezetés.....	5
2 Irodalmi áttekintés.....	6
2.1 Tokhalakról általánosságban	6
2.2 Korai teóriák a rák eredetéről	7
2.3 Hal daganatok	7
2.4 Halak virosisa	8
2.5 Vírusok keresése – PCR technikák.....	10
3 Célkitűzések	12
4 Anyag és módszer	13
4.1 Minták.....	13
4.1.1 Mintagyűjtés és mintavétel.....	13
4.2 PCR.....	16
4.2.1 A minták előkészítése.....	16
4.2.2 DNS izolálás.....	17
4.2.3 RNS izolálás	24
4.2.4 Gél elektroforézis	26
4.2.5 Szekvenálás előkészítése.....	26
4.3 Sejttenyészetek	27
4.3.1 A sejtek előkészítése a fertőzésre	27
4.3.2 A minták előkészítése.....	28
4.3.3 A sejtek fertőzése	28
4.3.4 További próbálkozások	29
5 Eredmények.....	30
5.1 Daganatok jelenléte magyarországi állományokban	30
5.2 A PCR vizsgálatok eredményei	30
5.2.1 Gélelektroforézis értékelése	30
5.2.2 A szekvenálás eredményének értelmezése.....	31
5.3 Sejttenyésztés.....	31
6 Megbeszélések, Következtetések	33
7 Összefoglalás.....	34
8 Summary	36

9	Köszönetnyilvánítás	38
	Irodalomjegyzék.....	39

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Rövidítés	Angol	Magyar
AciHV	Acipenserid herpesvirus	tokhal herpeszvírus
bp	base pair	bázis pár
CPE	cytopathogenic effect	cytopatogén hatás
dNTP	deoxyribonucleoside triphosphate	dezoxi-ribonukleozid-trifoszfát
ds	double-stranded	dupla szálú
DT	Dream Taq	
FCS	fetal calf serum	fötális borjúsavó
IcHV	Ictalurid herpesvirus	Harcsa herpeszvírus
IUCN	International Union for Conservation of Nature	Természetvédelmi Világszövetség
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry	
M199	medium 199	
MEM	minimal essential medium	
ncbi	National Center for Biology Information	
PCR	polimerase chain reaction	polimeráz láncreakció
rpm	revolutions per minute	percenkénti fordulatszám
ss	single-stranded	szimpla szálú
TAE puffer	tris-acetate-EDTA buffer	trisz-acetát-EDTA puffer
TE puffer	tris, EDTA buffer	trisz-EDTA puffer
TF		formalinos tok
TS		nyugat-magyarországi daganatos szibériai tok
WSIV	white sturgeon iridovirus	fehér tok iridovírusa

1 BEVEZETÉS

A daganatos megbetegedések nem új keletűek az orvoslás történetében, már több ezer évvel ezelőtt felismerték őket. A humán tumoros megbetegedésekre vonatkozó, valószínűsíthetően első írásos emlék a III. dinasztia-beli Dzsószér fáraó szolgálatában álló ókori tudós, Imhotep főpap feljegyzése az i. e. 27. századból (Varga, 2014). A legkorábbi bizonyíték a humán daganatokról egy, még az előbb említett leletnél is korábbra visszavezethető, 4 millió éves őskori előemberi csontkövület maradványa, amelyen a tumorokra jellemző jellegzetes elváltozások láthatóak (Javier és Butel, 2008).

Az állatorvoslásban a tumorok felismerése és jellemzése ennél jóval később történt meg. Az egyik első tudományos dokumentáció, amely a halak daganatos megbetegedésekben való érintettségét írja le, 1793-ból származik. Az értekezés a csontok tumoros elváltozásait taglalja (Anders és Yoshimizu, 1994).

A daganatok és a vírusok közötti összefüggést elsőként Peyton Rous bizonyította 1911-ben. Egy sarcomás Plymouth Rock csirkéből származó szűrt, sejtmentes tumorkivonattal fertőzött egy egészséges egyed, amelyben idővel kialakult egy az eredetihez hasonló daganat. Ez volt az első ismert tumor vírus, melyet felfedezője után Rous sarcoma vírusnak (RSV) neveztek el. Kezdetben lényegtelennek tartották ezt a felfedezést, mert úgy gondolták, hogy a tyúk és az ember közötti rokonság olyan távoli, hogy a humán rákkutatásban nem tudják jövedelmeztetni ezt az ismeretet, mert nem megfelelő modell állata az embernek, azonban 55 évvel a publikálás után Rous Nobel díjjal jutalmazták a korszakalkotó felfedezéséért. Azóta több kutatás is bizonyította a vírusok szerepét a tumor képződésben, és ennek az információnak az ismeretében nagy előrelépést remélnek a rákkutatásban (Javier és Butel, 2008).

Kutatásunk célja a hazánkban található tokhalak daganatainak vizsgálata volt. Magyarország területén a tokhalászat több ezer éves múltra tekint vissza, azonban napjainkban legtöbb fajuk az IUCN Vörös Könyve alapján a kritikusan veszélyeztetett kategóriába tartozik, így ennek köszönhetően szinte csak az akvakultúrás körülmények között tartott állományaik találhatóak meg a Kárpát-medencében.

2 IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 Tokhalakról általánosságban

A tokhalak ősi idők óta tartoznak a Föld vízi élőlényei közé. Már i. e. 600-ból is maradtak róluk emlékek a karthagói pénzérméket díszítő képmásuk formájában. Ezen túl Arisztotelész (élt i. e. 384 – i. e. 322) is megemlíti feljegyzéseiben a tokhalakat, miszerint akkor tájt a borászatban hasznos segédeszközként szolgált úszóhólyagjuk a bor tisztítás során. Továbbá nagy méretük miatt a középkorban is szívesen halászott halfajnak bizonyult, a rómaiak a faj megóvása érdekében a halpiacon elhelyezett márványtáblákon szabályozták a maximális fogási méretét. Magyarországon is már időszámításunk előtt megjelentek a tokhalak, amit a 7-9 ezer éves Győr környékéről származó maradványok bizonyítanak (Tokhalakról, é.n.).

Korábban hat őshonos tokhal faj volt jelen a Duna térségében: a viza (*Huso huso*), a vágótok (*Acipenser gueldenstaedtii*), a sőregtok (*Acipenser stellatus*), a kecsége (*Acipenser ruthenus*), a sima tok (*Acipenser nudiiventris*) és a közönséges tok (*Acipenser sturio*). Ma már csak az első négy jelenléte bizonyított a területen, melyből három a Természetvédelmi Világszövetség (IUCN) 2010. évi Vörös Könyve alapján a kritikusan veszélyeztetett fajok közé tartozik. A kivétel a kecsége, amely jelenleg a sebezhető kategóriában van, egyedszáma magasabb az előbbieknél, amit az is alátámaszt, hogy napjainkban ezt a fajt fogják a legnagyobb mennyiségben a Közép-Dunán (Tokhalakról, é.n.).

A tokfélék húsa és az ikrájukból készült fekete kaviár századok óta kedvelt termékeknek számítanak. Ennek köszönhetően nagy mennyiségben halászták ezeket a halakat, így létszámuk drasztikusan lecsökkent, és ezért napjainkra akvakultúras termelésük vette át a természetes vizekből történő fogások szerepét. Ma legelterjedtebben a lénai tokot (*Acipenser baerii*) tenyésztik Európában, ami a faj új környezethez való gyors alkalmazkodásának és magas téteményképességének köszönhető. Melegvízi körülmények között növekedésük felgyorsult, és ivarérésük is hamarabb következik be, ami további kedvező tényező a tenyészetekben való tartásuk szempontjából. Továbbá a legtöbb tokféle vándorló életmódot él, így miután kikeltek a lárvák, a folyók sodrása és saját mozgásuk révén eljutnak a tengerekig, és itt válnak ivaréretté, majd az ívás idejére ismét felúsznak a folyók felsőbb szakaszaira. A lénai tok ezzel ellentétben nem vándorló faj, egész életét a folyókban tölti, így édesvízi körülmények között nehézség nélkül tenyészthetőek (Tokhalakról, é.n.).

2.2 Korai teóriák a rák eredetéről

A 19. században alakult ki a tudományos onkológia módszertana, és ekkor kezdtek a mai ismereteink szerint helytálló feltevések születni. Elsőként Rudolf Virchow bizonyította, hogy a ráksejtek más, a szervezetben jelen lévő sejtekből származnak, de a korábbi, ma már igazoltan téves feltételezést, miszerint az áttétek folyadék útján terjednek a szervezeten belül egyik helyről a másikra, helytállónak találta. Végül Karl Thiersch volt az, aki belátta, hogy a metasztázisok a rosszindulatú tumorsejtek szóródásával jönnek létre. Ezeken túl Virchow feltevése volt az is, hogy a krónikus irritáció hozzájárul a rák kialakulásához. A mikrobiológia fejlődésével még ebben az évszázadban a fertőző ágensek felé terelődött a figyelem, és ekkor először felmerült a gondolat, hogy a baktériumoknak, gombáknak vagy protozoáknak is lehet szerepe a daganatok kialakulásában. A 19. század vége felé Dimitrij Ivanofsky és Martinus Beijerinck a jól ismert dohány mozaik vírus által jutott arra a felfedezésre, hogy léteznek a baktériumoknál kisebb fertőző ágensek is, melyeket később vírusoknak neveztek el. Nem sokkal ezután azonosították az első állat vírust (ragadós száj- és körömfájás vírusa), illetve az első humán vírust (sárgaláz vírusa), majd 1911-ben Peyton Rous igazolta a vírusok szerepét a tumor indukálásban (Javier és Butel, 2008).

2.3 Hal daganatok

Mielőtt bármely elváltozást részletesebben vizsgálnánk, fontos, hogy ne feledkezzünk meg a tényről, miszerint a halak poikilotherm élőlények, ezért bennük számos élettani folyamatot az évszakok, és ezáltal a víz hőmérsékletének változása határoz meg. Továbbá a halak immunválaszát is befolyásolja a víz hőmérsékletének változása és egyéb stresszorok, mint az ivási időszak kezdete. Egyes adatok szerint tavasszal, amikor a víz hőmérséklete elkezd változni, és a legtöbb hal ivása zajlik, akkor jelentkeznek legnagyobb számban a daganatok. Ezeken felül a vízhőmérséklet a vírusok szaporodását is befolyásolhatja (Coffee és mtsai, 2013).

Mint azt korábban említettük, az első tudományos feljegyzés halak daganatairól 1793-ból származik, amely egy pillangóhal tumor-szerű csontelváltozásait taglalja. Azóta sokat fejlődött a tudománynak ezen ága. Anders és Yoshimizu szerint (1994) a halakban észlelt tumorok 50 %-át a bőrdaganatok teszik ki, melyek típusát nagyban befolyásolja az évszak és a földrajzi helyeződés. Leggyakrabban jóindulatú epidermális hyperplasia és papilloma figyelhető meg. A hal daganatok kialakulásának okai változatosak, és gyakran multifaktoriális háttér feltételezhető. Bizonyított, hogy a folyamatosan fennálló bőr irritáció – mechanikai ok vagy

parazitás fertőzöttség miatt – tumor képződéshez vezethet, illetve egyéb, nem vírusos eredetű indukáló tényező lehet a karcinogén anyagok jelenléte a vízben vagy az UV sugárzás.

Az idényszerű ingadozás igen jellemző a daganatok előfordulási gyakoriságára. A tünetek az ívási időszak, a vándorló (katadrom – tengerből édesvízbe ívni felúszó) fajok ivadékaiban az édesvízi életről a sósvízi életre való átállás (angolban: smoltification), a gonádok differenciálódásának kezdete és a metamorfózis során jelentkeznek leggyakrabban. Ezekben az esetekben komoly endokrinológiai változások mennek végbe az állatok szervezetében, amelyek feltehetően mind a bőr állapotára, mind a kapcsolódó vírusok szaporodására hatással vannak. Ezek a változások a megemelkedett endokrin aktivitás eredményeként fellépő immunszuppresszió következményeként magyarázhatóak. Ezen túl a környezeti hatások is hozzájárulhatnak a folyamat romlásához. Továbbá, megfigyelték, hogy a magas szexhormon szint proliferációt idéz elő az epidermiszben, így tumor promoterként működve a fertőző ágensek számára megfelelő, fogékony környezetet alakít ki. Az immunszuppresszió következtében az addig látens endogén vírusok is szaporodni kezdenek. A vírusok hatására epidermális és fibroblaszt sejtek proliferációja indul meg, ami végül a tumor kialakulásához vezet, a karcinogén anyagok és/vagy az alacsony víz hőmérséklet tovább fokozhatják ezt a folyamatot. Az elváltozások néhány esetben spontán visszafejlődnek, és nem hagynak nyomot maguk után (Anders és Yoshimizu, 1994).

2.4 Halak virosisa

Ahogy más tenyésztett halfajoknál, a telepeken tartott tokhalak esetében is a betegségek bizonyultak az elsődleges limitáló tényezőnek, illetve a fertőző ágensek közül a vírusok által okozott megbetegedések járnak a legnagyobb anyagi károkkal az iparág számára (Shchelkunov és mtsai, 2009). Napjainkban, a tokhal gazdaságokban megjelenő magas mortalitással rendelkező epizootiás betegségek gyakran jelentős gazdasági veszteséggel járnak. Kínában többször előfordult már az egy év alatti állományokban tömeges elhullás, azonban egyetlen letális baktériumot, parazitát vagy gombát sem tudtak kimutatni a tetemekből. Végül a jellegzetes járványtani adatok, a boncolás, az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok és a gyógyítási kísérletek alapján vírusos hátteret gyanítottak. Többnyire tenyészetekben lévő halakat vizsgáltak a kísérletek során, nem természetes vizekben élőket. Általában a fiatal egyedekben magas mortalitású volt a vírus, míg a felnőttekből nem tudták kimutatni azt (Hua és Wang, 2005).

Az adeno-, papova-, irido- és herpeszvírusok között találhatjuk meg a leggyakrabban előforduló tokhal specifikus vírusokat. Ezek közül a fehér tok iridovirusa (WSIV) és az acipenserid herpeszvírus-2 (AciHV-2) gazdaságilag a legjelentősebb patogének, mivel az elhullások 95 %-át okozzák (Shchelkunov és mtsai, 2009).

Hua és Wang a fehér tok iridovirusát (WSIV) két sejtvonalon, WSS-2 (white sturgeon spleen) és WSSK-1 (white sturgeon skin) kísérte meg kimutatni. A sejteket 20 °C-ra beállított inkubátorban tárolták, minimal essential medium (MEM) használata mellett, ami 10 % főtális borjúsavot tartalmazott, majd azt a vírussal való fertőzés után 5 %-ra csökkentették. A WSIV szaporodása során fontos befolyásoló tényező volt a víz hőmérséklete, mivel bizonyos kutatások szerint a vírus csak 15 és 20 °C között szaporodik megfelelő mértékben, ezen tartományon kívül eső esetekben csak gyengén vagy egyáltalán nem. A horizontális, víz közvetítette fertőzés a keltetőben és kísérleti körülmények között a laboratóriumban is kivitelezhető volt; a lárvákon a vírusra jellemző klinikai tünetek voltak megfigyelhetőek. Ezzel szemben a felnőtt egyedek ellenállóknak bizonyultak a vírussal szemben, klinikai tünetek nem alakultak ki rajtuk, de szubklinikai hordozókká váltak, és időszakosan ürítették a vírust. Bizonyos feltételezések szerint a vertikális fertőzés is lehetséges az ivari váladékokon keresztül, de eddig felnőtt egyedből soha nem sikerült izolálni a vírust (Hua és Wang, 2005).

A fehér tok iridovírussal ellentétben a fehér tok herpeszvírus-1 (WSHV-1, amely ma már az Acipenserid herpeszvírus-1 nevet viseli) fertőzés esetén a hat hónapnál fiatalabb egyedek nem mutattak tüneteket az elhullásig, míg a felnőtt egyedeken a kültakaró és az oropharyngeális nyálkahártya gyulladása volt megfigyelhető. A vírus WSSK-1 sejteken izolálhatónak bizonyult (Hua és Wang, 2005).

A retrovírusok vizsgálata napjainkra már kiforrott módszerek alapján működik. Egyes esetekben vírus szekvenálásra és sikeres fertőzési kísérletekre van szükség, más esetekben retrovírus-szerű részecskék kimutatását vagy a reverz transzkriptáz aktivitás megállapítását kell elvégezni a proliferatív szövetekből. Ma a csekély rendelkezésünkre álló hal sejtvonal miatt inkább PCR technika segítségével sokszorozzák a retrovírusokat, majd szekvenálják a terméket (Coffee és mtsai, 2013).

Több retrovírussal összeköthető esetben is előfordult, hogy az elváltozások időszakosan mutatkoztak. Az északi süllők (*Sander vitreus*) dermális sarcomája jellemzően először késő ősszel jelentkezett, és fennmaradt egészen tavaszig, amikor az ívási időszak alatt még észlelhető volt, majd késő tavasztól nyár végéig visszahúzódtak. A fertőzött egyedeken ezt követően nem jelentkeztek hasonló daganatok. Ennek alapján feltételezhetjük, hogy a retrovírussal történt fertőződés élethosszig tartó rezisztenciát eredményezett. Egy másik esetben atlanti lazacokon

(*Salmo salar*) figyeltek meg epidermális papillomatozist, az elváltozások a nyár folyamán alakultak ki, és spontán visszahúzódtak az ősz, illetve a tél során (Coffee és mtsai, 2013).

Az epizootiás jelleg és az évszaki ingadozás, ami jellemzi ezeket a betegségeket, fertőző, hormonális vagy környezeti háttér okok jelenlétét valószínűsíti. Továbbá, a tenyészetekben évről évre jelentkező, egyre súlyosabb tüneteket produkáló, az állomány egyre nagyobb részét érintő betegségek még inkább alátámasztják a fertőző ágensek jelenlétének gyanúját. Több retrovírussal kapcsolatba hozható esetben is előfordult a kötőszövet csontos metapláziája (Coffee és mtsai, 2013).

A legtöbb vírusos eredetű megbetegedés esetén a másodlagos baktérium fertőzés volt az elhullás oka. Megelőző intézkedések és szűrőpróba szerű vizsgálatok javasoltak már a fiatal egyedeknél a betegségek megelőzése céljából, mert a vírusos betegségek kezelése igen nehézkes, emellett a lefolyása olyan gyors lehet, a baktériumos felülfertőződés miatt is, hogy nem jut idő a gyógyszerek alkalmazására (Hua és Wang, 2005).

2.5 Vírusok keresése – PCR technikák

A munkánk során gyakran alkalmazott polimeráz láncreakciós technika az utóbbi évek, évtizedek során komoly fejlődésen ment keresztül. Amikor Hua és Wang (2005) végezte kísérleteit a PCR technika még nem volt elég szenzitív, de már akkor meg tudták előlegezni, hogy nagy jövő áll ez előtt a módszer előtt. Ezzel szemben Coffee és munkatársai (2013) már a PCR-t részesítették előnyben, mint kimutatási módszert a sejtvonalakkal szemben, amik korlátozott mennyiségben álltak rendelkezésükre.

A másik sokak által említett módszer (Anders és Yoshimizu, 1994; Hua és Wang, 2005; Shchelkunov és mtsai, 2009; Coffee és mtsai, 2013) vírusok kimutatására a sejttenyészetek alkalmazása. Shchelkunov és munkatársai (2009) az SSO-2 sejtvonalat használták kutatásaik során, melyet szibériai tok belső szerveiből (lép, vese, máj) hoztak létre. A sejteket 96 well-es platerre tették és ehhez a sejtvonalhoz médium 199-et használtak, amihez 10 % főtális borjúsavót és 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ gentamicint adtak hozzá. A sejteket a vírussal való fertőzés után 1 napig 19 °C-on tárolták, majd áttették 15 °C-ra, és naponta fénymikroszkóp alatt vizsgálták, vírusok cytopatogén hatásának (CPE) jeleit keresték. Az első változások a harmadik napon jelentkeztek, amikor a sejt monolayer folytonossága megszakadt, majd 2-9 nappal később az összes sejt elpusztult. A CPE az ezt követő passzázsokon is jelentkezett, így egyértelművé téve egy cytopatogén ágens jelenlétét.

Egy másik kutatás keretei között Hua és Wang (2005) a WSS-2 sejtvonalat alkalmazta patogén ágensek detektálására. A sejtekhez 10 % főtális borjúsavót tartalmazó MEM-et használtak, valamint 20 °C-os inkubátorban tárolták azokat. A sejtek fertőzésekor az FCS szintjét 5 %-ra csökkentették. Ezen sejtvonal alkalmazásával sikeresen ki tudták mutatni a WSIV jelenlétét.

Ezeket túl vírus átviteli próbákkal is bizonyíthatjuk az ágensek jelenlétét. Az egyik ilyen módszer a tumor homogenizátum sejtmertes filtrátumával történő kísérleti fertőzés, melynek során a szűrletet az izomba oltva, etetve vagy helyileg is alkalmazhatjuk. Továbbá egészséges egyedek fertőzöttekkel való együttélése során történő megbetegedése is jelezheti számunkra a vírus jelenlétét (Coffee és mtsai, 2013).

Ezek mellett sok más módszer létezik a vírusok megjelenítésére, mint például az immunhisztokémia, az in situ hibridizáció (Coffee és mtsai, 2013), az elektronmikroszkópos vizsgálatok, az idiopatikusan elváltozások fénymikroszkópos vizsgálata (Anders és Yoshimizu, 1994).

3 CÉLKITŰZÉSEK

Az alábbiakban tárgyalandó vizsgálataink alapját egy dunántúli halgazdaságban nevelt különböző korú szibériai vagy más néven lénai tok (*Acipenser baerii*) állományban 2016 őszén tömegesen megjelenő, majd 2017 tavaszának végére visszafejlődő daganatos elváltozások adták. A jelenség, a szakirodalmi adatok tükrében, vírusfertőzés fennállásának gyanúját keltette. Coffee és munkatársai (2013) szerint a retrovírussal fertőzött egyedekben a daganatok stresszorok hatására jelentek meg, ami többek között lehet az ívási időszak kezdete az endokrin változások miatt, az évszakok váltakozása a hőmérséklet-változás miatt, esetlegesen mechanikai irritáció vagy a vízben jelen lévő kemikáliák. Az elváltozások visszafejlődése és a korábban érintett egyedek élethosszig tartó daganatoktól való mentessége alapján feltételezhető, hogy a tumor kialakulása élethosszig tartó rezisztenciát eredményez a retrovírusokkal szemben. Ezen ismeretek tudatában kezdtünk neki vizsgálatainknak, melyek célja a tokhalakon található daganatokból és/vagy szerveikből vírusok kimutatása, és így a vírusos háttér bizonyítása volt. A mintagyűjtés során telefonon kerestük meg hazánk tokhal tartó telepeit, és az így gyűjtött adatok alapján megbecsülhetőnek találtuk, hogy Magyarország egyes területein milyen gyakorisággal fordul elő hasonló jelenség.

A munkánk során végzett molekuláris vizsgálatok anyagi háttérét a GINOP GOODFISH projekt biztosította.

4 ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1 Minták

4.1.1 Mintagyűjtés és mintavétel

A kutatás gondolatát felvető halgazdaságból a későbbiekben szerettünk volna mintát gyűjteni, de a tulajdonos bevallása szerint a daganatok megszűntek, az új állományban nem voltak jelen. A látogatásunkat nem tartotta kívánatosnak.

Ettől függetlenül a témát érdemesnek tartottuk a részletesebb kivizsgálásra, ezért Magyarország többi tokhal telepén is érdeklődtünk, van-e daganatos haluk. Egy nyugat-magyarországi telepvezető vállalta, hogy együttműködik velünk. Innen egy szibériai tok (továbbiakban TS) (*Acipenser baerii*) érkezett az intézetbe (1. kép), aminek a baloldali mellúsóján egy karfiolszerű, körülbelül 8 cm átmérőjű kemény tapintatú porcos daganat volt észlelhető (2. kép). Ennek az egyednek több szervéből (máj, lép, vese, szív, kopolyú) és a tumorból is kimetszettünk egy-egy darabot és 2 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük, majd – 80 °C-ra lefagyasztottuk a nukleinsavak károsodásának megelőzése érdekében.

Továbbá egy tenyészetből formalinban tartósított szibériai tokhalakat (továbbiakban TF) kaptunk (3. kép), ez 3 darab körülbelül 15 cm hosszúságú fiatal egyed volt. Rajtuk, a törzs háti oldalán, nagyjából közép tájékon kisméretű kiemelkedés, illetve a bőrön apró fekélyek és szerkezeti elváltozás volt észlelhető (4. kép). A bőrből, illetve a testüreg megnyitása után a májból és a veséből mintát vettünk, és ezeket is Eppendorf csövekbe helyeztük, majd lefagyasztottuk.

A további megkeresett magyarországi telepeken nem találtak daganatos egyedet. Az alacsony hazai mintaszám miatt, egy németországi tokhal teleppel is szeretnénk volna felvenni a kapcsolatot, de e-mailes megkeresésünkre nem kaptunk választ. Ennek következtében, korábbi, már előkészített mintákat kényszerültünk felhasználni. Ezek között egy Kisbajcsról származó szibériai (KB szibériai) tok és egy lapátorrú (KB lapátorrú) tok (*Polyodon spathula*), egy Hollandiából származó tokhal minta (Holland tok), egy akasztói tokhal korábban sejttenyészetre oltott, majd egyszer passzált, nukleinsav kimutatásra előkészített formája (Akasztó 2. p.), illetve TE10 és TN3 kóddal jelzett egyedek lépe és veséje szerepelt.

1. kép: Nyugat-magyarországi daganatos szibériai tok.



2. kép: A baloldali mellűszón jelentkező daganat.



3. kép: Formalinban tartósított szibériai tokhalak.



4. kép: A TF egyedeken a törzs háti oldalán jelentkező kisméretű kiemelkedés, illetve a bőrön lévő apró fekélyek és szerkezeti elváltozás



4.2 PCR

A különböző, tumorképződéssel kapcsolatba hozható vírusok kimutatását (DNS vírusok: (ds) herpesz-, adeno-, irodovírus, és (ss) cirkovírus; valamint RNS vírusok: (ds) aquareovírus, és (ss) retrovírus) PCR technika segítségével igyekeztünk megvalósítani. Munkánk során a Simpli Amp™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) gépet használtuk.

4.2.1 A minták előkészítése

A molekuláris munkálatokhoz a szervekből, kommerciális kittek eljárásait követve, genomiális DNS-t és RNS-t egyaránt izoláltunk. A TE10 kóddal jelölt tokhal veséjét és lépét a Quiagen, Quick-Start Protocol, DNeasy Blood & Tissue Kittel készítettük elő a PCR reakcióhoz. A TS tokon a Geneaid Genomic, DNA Mini Kit (Tissue)-t alkalmaztuk.

A TF egyedet először egyszeres töménységű TE oldatba helyeztük 20 percre a formalinból. Ezt úgy készítettük, hogy százszoros töménységű TE puffert desztillált vízzel hígítottuk, majd Rodríguez és munkatársai (2002) publikációjának első melléklete alapján előkészítettük a mintát a nukleinsav kivonásra. Ehhez 4 ml Extraction Buffert állítottunk össze, melynek összetételét az 1. táblázat tartalmazza.

Reagens	Mennyiség
100x TE	400 µl
NaCl	0,023 g
SDS	0,080 g
Dithiothreitol (1M)	200 µl
Nukleázmentes víz	3,4 ml

1.táblázat: Extraction Buffer összetétele (Rodríguez és mtsai, 2002)

Végül a Geneaid, Viral Nucleic Acid Extraction Kit II-t és a Geneaid Genomic, DNA Mini Kit (Tissue)-t is használtuk külön-külön, a biztosabb nukleinsav kinyerés érdekében.

Az RNS kivonás első lépéseként a Purification of RNA or Multiple Analytes from Animal and Human Tissue Protokollt alkalmaztuk a TS máj, szív, vese, kopolyú, tumor és lép mintákon, illetve a sejtek fertőzésére használt eredeti TS lép és tumor minta hússzoros hígításán, és az ezekkel először fertőzött sejtekről leszívott felülúszókon. Első lépésként 5 ml RLT puffert 50 µl β-merkaptotetanollal elegyítettünk, melyből később a sejtekhez (maximum 100 µl-nyi) 350 µl-t, a szövetekhez (maximum 30 mg-os darabok) 600 µl-t adtunk. A szöveteket tartalmazó csövekbe acél golyót helyeztünk, majd TissueLyser alkalmazásával 5 percig 50 Hz-en

homogenizáltuk a mintákat. Ezt követően az összes mintát 3 percig centrifugáltuk 13000 rpm-en. A folyamat végeztével a felülúszót leszívtuk, és 2 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük, illetve az így kapott minták térfogatával megegyező mennyiségű 70 %-os etanolt adtunk hozzájuk, majd a Quiagen RNeasy Mini Kit 3. pontjától folytattuk munkánkat (Qiagen, 2009).

Az RNS cDNS-re átírásának előkészítéséhez a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kitet vettük igénybe. Ennek részletes leírása az Anyag és módszer részben található meg (Thermo Fisher Scientific Inc, 2013).

4.2.2 DNS izolálás

Hanson

Elsőként a korábbi vizsgálatok alapján negatívnak vélt TE10 vese és lép, illetve TN3 vese mintákkal végeztünk el egy PCR reakciót Hanson primerek alkalmazásával, amelyek herpesz, adeno- és iridovírusokra specifikusak (Hanson és mtsai, 2006). A reakcióhoz a primerekből tízszeres hígítást használtunk. A későbbiekben negatív kontrollnak szántuk ezeket a mintákat. A folyamat során alkalmazott primereket (2. táblázat), protokollt (4. táblázat), és hőprofil (5. táblázat) alább foglaltuk össze. A 3. táblázat a munkánk során felhasznált primerekben szereplő kevert bázisokat foglalja magába. A folyamat végén 400 és 700 bp közötti vagy 1200 bp hosszúságú termékeket vártunk (Hanson és mtsai, 2006).

Primer	Szekvencia 5'-3'
Forward	CGG AAT TCT AGA YTT YGC NWS NYT NTA YCC
Reverse	CCC GAA TTC AGA TCT CNG TRT CNC CRT A

2. táblázat: Hanson primerek szekvenciája

IUPAC kód	Bázisok	IUPAC kód	Bázisok
R	A vagy G	Y	T vagy C
S	G vagy C	W	A vagy T
N	A, C, G vagy T	K	G vagy T
M	A vagy C	B	C, G vagy T
H	A, C vagy T	V	A, C vagy G
I (inozin)	A, C, G vagy T		

3. táblázat: International Union of Pure and Applied Chemistry nukleotid kódok bázis megfelelői. (IUPAC)

Reagens	Térfogat (µl)
Hanson forward primer	0,62
Hanson reverse primer	0,62
Dream Taq puffer	5
dNTP	4
MgCl ₂	1,5
Taq polimeráz	0,5
Nukleázmentes víz	34,76
templát	3

4. táblázat: Hanson PCR-hez használt protokoll

Lépés	°C	Idő	Ciklusok
Kezdeti denaturáció	95	2 perc	1
Denaturáció	95	30 másodperc	45
Anellálás	45	2 perc	
Polimerizáció	72	3 perc	
Terminális szintézis	72	4 perc	1
Tárolás	4	∞	

5. táblázat: Hanson hőprofil

A Hanson primereket a későbbiekben még sok más mintán alkalmaztuk. Ezek a következők voltak: TS lép, máj, vese, tumor; TF virális és tissue kittel előkészített mája, bőre, veséje; KB szibériai tok; KB lapátorrú tok; Akasztó 2. passzázs; Holland tok. Ezen vizsgálatok során a TE10 lép mintát használtuk pozitív kontrollnak.

Tok Pol – tervezett primerek

Témavezetőm, Borzák Réka tervezett egy primer párt (6. táblázat) a Hanson primerek használata során kapott eredmények részletesebb vizsgálata céljából. A protokollt a 7. táblázat, a hőprofil a 8. táblázat tartalmazza.

Primer	Szekvencia 5'-3'
Forward	GAT AGA TGT CAA CGT CAG CC
Reverse	AGT AAA GGA GCG ACT CCG AA

6. táblázat: Tok Pol Primerek

Reagens	Térfogat (μl)
Tok Pol forward primer	1
Tok Pol reverse primer	1
Dream Taq puffer	2,5
dNTP	0,5
Taq polimeráz	0,2
Nukleázmentes víz	17,8
templát	2

7. táblázat: Tok Pol protokoll

Lépés	°C	Idő	Ciklusok
Kezdeti denaturáció	95	3 perc	1
Denaturáció	95	30 másodperc	45
Anellálás	53	1 perc	
Polimerizáció	72	1 perc	
Terminális szintézis	72	4 perc	1
Tárolás	4	∞	

8. táblázat: Tok Pol hőprofil

Ezt a reakciót elvégeztük az eddig említett összes mintával, harcsa és törpeharcsa DNS-sel és egy Ictalurid herpesvírus-2 (IcHV-2) mintával. Pozitív kontrollnak ebben az esetben is a TE10 lép mintát használtuk.

Tok irido

A következő ágens, amit megkíséreltünk kimutatni egy tok iridovírus volt. Ezeket a primereket (9. táblázat) is témavezetőm, Borzák Réka tervezte. A primer törzsoldatból ötszörös hígítást készítettünk, ami így 20 μM-os lett. A mintáink a TS lép, máj vese és a tumor voltak. Az itt használt protokoll és hőprofil a feljebb említett Tok Pol primereknél alkalmazott, 7. és 8. táblázatban leírtakkal megegyező.

Primer	Szekvencia 5'-3'
Forward	TTC TCT CTT TGC CAT GAC AC
Reverse	CAT ACC GTA ATT RTC CCA CTG

9. táblázat: Tok irido primerek

Cyprinid Herpes

A cyprinid herpes kimutatásához háromféle primer párt (10. táblázat) is használtunk, annak reményében, hogy így sikeresebb lesz a nukleinsavak kimutatása; ezek a helikáz, a termináz és a polimeráz voltak (Doszpoly és mtsai, 2015). Ebben az esetben Taq polimeráz helyett Phusion

polimerázt alkalmaztunk. Mintaként a TS tumort, pozitív kontrollként egy Koi herpeszvírus (KHV) mintát használtuk. Az alkalmazott protokollt és hőprofil a 11. és 12. táblázat tartalmazza.

Primer	Szekvencia 5'-3'
Termináz forward	GCG CTG AGK ATG TCG TCY TTG
Termináz reverse	YGA CAT CTA CAA GCC CGA CCA
Helikáz forward	GTG GGC TCA GTC ACA CAG CT
Helikáz reverse	CCC TGG CAA AAG TAG GTG TTC AT
Polimeráz forward	GGN GCN ATG GTN CAR WSN ACN AA
Polimeráz reverse	ACN GTN GCN GTR TTY TCR TAN GC

10. táblázat: Cyprinid herpeszhez Helikáz, Termináz, Polimeráz primerek

Reagens	Térfogat (µl)
Phusion 5x HF puffer	10
dNTP	1,5
forward primer	3
reverse primer	3
Phusion polimeráz	0,5
Nukleázmentes víz	30
templát	2

11. táblázat: Cyprinid herpesz protokoll

Lépés	°C	Idő	Ciklusok
Kezdeti denaturáció	98	3 perc	1
Denaturáció	98	10 másodperc	45
Anellálás	62	30 másodperc	
Polimerizáció	72	1 perc	
Terminális szintézis	72	3 perc	1
Tárolás	4	∞	

12. táblázat: Cyprinid herpesz hőprofil

Két körös tok herpesz primerek

A primereket (13. és 17. táblázat) Dr. Doszpoly Andortól kaptuk, aki korábbi munkája során tervezte azokat (Doszpoly és Shchelkunov, 2010). A reakciókhoz a következő mintákat használtuk: a TF tok virális és tissue kittel tisztított formájából mind a hármát, azaz a máj, a bőr és a vese mintát is, a TS máj, lép, tumor és vese, a TN3 lép és a TE10 lép mintákat, illetve a KB lapátorrú és szibériai tok, az Akasztó 2. p., a törpeharcsa DNS és a Holland tok mintákat. Pozitív kontrollnak egy harcsa IchV-s mintáját választottuk. A primerekhez használt protokollokat és hőprofil a 14., 15. és 16. táblázat tartalmazza.

Aci out és in (ORF57-62)

Primer	Szekvencia 5'-3'
Aci out forward	AAG ACG TGA CCT ACG ACA AGC TCG AT
Aci out reverse	TTG ACG GAC ACA TTG GAT TAA ACG AT
Aci in forward	CTT GAT TGA TTC TCA GCT GGT TGT GC
Aci in reverse	TTT AAA CAA GTC ACT TCC AAA TTG GT

13. táblázat: Aci out és in primerek

Reagens	Térfogat (µl)
Aci forward primer	1
Aci reverse primer	1
Dream Taq puffer	5
dNTP	1
Taq polimeráz	0,5
Nukleázmentes víz	39,5
templát	2

14. táblázat: Aci out (1. kör) protokoll

Reagens	Térfogat (µl)
Tok irido forward primer	1
Tok irido reverse primer	1
Dream Taq puffer	5
dNTP	1
Taq polimeráz	0,5
Nukleázmentes víz	40,5
templát (elegy az előző reakcióból)	1

15. táblázat: Aci in (2. kör) protokoll

Lépés	°C	Idő	Ciklusok
Kezdeti denaturáció	95	3 perc	1
Denaturáció	95	30 másodperc	35
Anellálás	56	30 másodperc	
Polimerizáció	72	30 másodperc	
Terminális szintézis	72	7 perc	1
Tárolás	4	∞	

16. táblázat: Aci out/in és Ic in hőprofil

Az Ic out hőprofilja megegyezik az Aci outéval, azzal a különbséggel, hogy az 56 °C helyett 46 °C-ot alkalmaztunk az anellálás során.

Ic out és in (ORF57-58)

Primer	Szekvencia 5'-3'
Ic out forward	AAG GSV CAG ATT YTC ATG
Ic out reverse	TCA CRW ASC CBC CYC TCC
Ic in forward	GAY ATG ATG TAY GTG TGY AA
Ic in reverse	ACM CCY CGK GTG TGY GCG GC

17. táblázat: Ic out és in primerek

Circovírus

A primereket (18. táblázat) Halami és munkatársai (2008) publikációja alapján rendeltük. A TS máj, lép, vese, tumor és a TF virális máj, bőr és vese mintákon végeztük el a reakciót. A tok herpesz primerekénél tapasztaltakhoz hasonlóan itt is két körös reakcióval (19. táblázat) a nested PCR technikát alkalmaztuk. Pozitív kontrollnak a 2Q mintát használtuk, ami egy angolna cirkovírus (EeCV-1) tartalmú minta volt. A hőprofil a 20. táblázat írja le.

Primer	Szekvencia 5'-3'
Cv-s (forward)	AGA GGT GGG TCT TCA CNH TBA AYA A
Cv-as (reverse)	AAG GCA GCC ACC CRT ARA ART CRT C
Cn-s (forward)	AGC AAG GAA CCC CTC AYY TBC ARG G
Cn-as (reverse)	ACG ATG ACT TCN GTC TTS MAR TCA CG

18. táblázat: Circo primerek

Reagens	Térfogat (µl)
Cv-s (forward) primer	0,5
Cv-as (reverse) primer	0,5
Dream Taq puffer	2,5
dNTP	0,5
Taq polimeráz	0,15
Nukleázmentes víz	18,85
templát	2

19. táblázat: Corcovírus 1. kör protokoll

A második kör során a Cn-s és Cn-as primereket vettük igénybe, illetve templátként az első kör termékét adtuk hozzá az elegyhez.

Lépés	°C	Idő	Ciklusok
Kezdeti denaturáció	95	5 perc	1
Denaturáció	94	30 másodperc	45
Anellálás	56	1 perc	
Polimerizáció	72	1 perc	
Terminális szintézis	72	5 perc	1
Tárolás	4	∞	

20. táblázat: Circo hőprofil

Lymphocystis disease vírus (LCDV)

Ezen ágens vizsgálatára korábbi évek során témavezetőm, Borzák Réka által tervezett primereket (21. táblázat) használtunk. Ez esetben a TS máj, lép, vese, tumor és a TF virális máj, bőr és vese mintákat vizsgáltuk. A termék várt hossza 614 bp volt. A protokollt és a hőprofilát a 22. és 23. táblázatban foglaltuk össze.

Primer	Szekvencia 5'-3'
LCDV forward	CYT GGT TCA GTA AAT TAC C
LCDV reverse	CRT TRG TAA TCC ATA CTT G

21. táblázat: LCDV primerek

Reagens	Térfogat (µl)
LCDV forward primer	1
LCDV reverse primer	1
Dream Taq puffer	5
dNTP	1
Taq polimeráz	0,3
Nukleázmentes víz	38,7
templát az első körből	3

22. táblázat: LCDV protokoll

Lépés	°C	Idő	Ciklusok
Kezdeti denaturáció	95	3 perc	1
Denaturáció	94	30 másodperc	35
Anellálás	47	30 másodperc	
Polimerizáció	72	1 perc	
Terminális szintézis	72	7 perc	1
Tárolás	4	∞	

23. táblázat: LCDV hőprofil

4.2.3 RNS izolálás

Az RNS kivonást a TS máj, szív, vese, kopolyú, tumor és lép mintákból, illetve a sejtek fertőzésére használt eredeti TS lép és tumor minta hússzoros hígításából, valamint az ezekkel először fertőzött sejtekről leszívott felülúszókból kíséreltük meg elvégezni.

RNS-ről cDNS átírás

Az RNS-ek cDNS-re való átírását a RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit segítségével végeztük el (Thermo Fisher Scientific Inc., 2013). A fő protokollt a 24. táblázatban foglaltuk össze.

Reagens	Térfogat (μl)
5x Reaction Buffer	4
RiboLock Rnase Inhibitor (20 U/μl)	1
dNTP (10 mM)	2
RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/μl)	1
templát	8

24. táblázat: cDNS átírás protokoll

Aquareovírus

Első RNS vírusként az aquareovírust szeretnénk volna kimutatni. A munkánk során alkalmazott primereket (Seng és mtsai, 2004), protokollt és hőprofilot a 25., 26. és 27. táblázat tartalmazza. Pozitív kontrollnak a kitehez tartozó pozitív kontrollt használtuk, ami a cDNS átírás ellenőrzését szolgálta. A várt termék körülbelül 450 bp méretű volt.

Primer	Szekvencia 5'-3'
Aquareo AQ1 (forward)	AWS CCK TAY ATC TAT GGC TT
Aquareo AQ2 (reverse)	TTR GAG ACG AAM AKN GAS GC

25. táblázat: Aquareovírus primerek

Reagens	Térfogat (μl)
Aquareo forward primer	1
Aquareo reverse primer	1
10+ Dream Taq puffer	5
dNTP (10 mM)	1
Taq polimeráz	0,5
Nukleázmentes víz	36,5
cDNS	5

26. táblázat: Aquareovírus protokoll

Lépés	°C	Idő	Ciklusok
Kezdeti denaturáció	95	3 perc	1
Denaturáció	94	30 másodperc	30
Anellálás	49	30 másodperc	
Polimerizáció	72	1 perc	
Terminális szintézis	72	5 perc	1
Tárolás	4	∞	

27. táblázat: Aquareovírus hőprofil

Retrovírus

A reakcióhoz a Ron és munkatársai (1996) által leírt primereket (28. táblázat) használtuk. A folyamat végén 600 és 1000 bp közti terméket vártunk. A protokollt és a hőprofil a 29. és 30. táblázatban foglaltuk össze.

Primer	Szekvencia 5'-3'
PRO Forward	GTK TTI KTI GAY ACI GGI KC
JO Reverse	ATI AGI AKR TCR TCI ACR TA

28. táblázat: Retrovírus primerek

Reagens	Térfogat (µl)
Retrovírus forward primer	1
Retrovírus reverse primer	1
10+ Dream Taq puffer	5
dNTP (10 mM)	1
Taq polimeráz	0,5
bidesztillált víz	36,5
cDNS	5

29. táblázat: Retrovírus protokoll

Lépés	°C	Idő	Ciklusok
Kezdeti denaturáció	95	3 perc	1
Denaturáció	94	30 másodperc	35
Anellálás	49	1 perc	
Polimerizáció	72	1 perc	
Terminális szintézis	72	7 perc	1
Tárolás	4	∞	

30. táblázat: Retrovírus hőprofil

4.2.4 Gél elektroforézis

A PCR reakció után 1%-os agarózgél készítettünk (0,5 g agaróz, 50 ml TAE puffer elegyítésével és melegítésével, majd 1,2 µg etídium-bromid hozzáadásával), és agargél elektroforézis igénybe vételével 45 percig futtattuk a mintákat, majd UV fény alatt megtekintettük az eredményt. Az esetek nagy hányadában Thermo Scientific GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder-t használtunk markerként, egyedül a Doszpoly-féle tok herpeszeknél alkalmaztuk a Thermo Scientific O'GeneRuler Low Range DNA Ladder-t.

Ha az eredményt kedvezőnek találtuk, azaz a keletkezett termék a megfelelő mérettartományba tartozott, akkor tovább dolgoztunk az adott mintával. Abban az esetben ha a gélképen egy oszlopban több csík is jelentkezett különböző magasságban, akkor 2 %-os agarózgél öntöttünk, és a pozitív mintákat hosszabb ideig újra futtattuk, majd kivágtuk a gélből a megfelelő méretű csíkokat. Ezt követően a Genaid, Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit segítségével kinyertük a nukleinsavakat a gélből. Ha megfelelő mennyiségű PCR termékünk maradt, illetve csak egy csík látszott a gélképen mintánként, akkor nem kellett újra futtatni a terméket, hanem a Molecular Biology Kit Protocol for Purification of PCR Products pontja alapján kitisztítottuk azt. NanoDrop gép segítségével lemértük a minták nukleinsav tartalmát.

4.2.5 Szekvenálás előkészítése

Ez után elvégeztük a szekvenáló reakciót, amit a 31. táblázatban foglaltunk össze. Ezt a folyamatot mindig a PCR boxban végeztük el és a szekvenálás előkészítését szolgálta. A primer mindig a PCR reakcióban használttal megegyező kellett legyen. A két primert külön-külön reakció elegyhez adtuk hozzá.

Reagens	Térfogat
Big Dye enzim	1 µl
Big Dye puffer	2 µl
primer	1 µl
templát	1-6 µl (50-100 ng nukleinsav)
Nukleázmentes víz	az elegy kiegészítése 10 µl-re

31. táblázat: Szekvenáló reakció

Ezt követően a kicsapás következett. Ez a folyamat azt a célt szolgálta, hogy a minta megfelelő állapotba kerüljön a szállításhoz, hiszen a szekvenálást nem az intézetben végeztük, mert nem állt rendelkezésünkre megfelelő gép, hanem Szegedre küldtük a Magyar Tudományos Akadémia Szegedi Biológiai Központ Szekvenáló Laboratóriumába. A kicsapást két szakaszban végeztük el. Először a PCR boxban összeállítottunk egy elegyet, amit 32. táblázat tartalmaz.

Reagens	Térfogat (µl)
90-100%-os etanol	62,5
Nukleázmentes víz	14,5
nátrium-acetát	3

32. táblázat: Kicsapás

Ennek az össztérfogata 80 µl lett, ami két mintához volt elegendő. Az elegyet az összemérés után vortexeltük, majd két részre osztottuk és mindegyikhez hozzáadtunk 10 µl tisztított terméket, és így is vortexeltük. Az ezt követő lépéseket már nem a PCR boxban végeztük el. 15 percig szobahőmérsékleten állni hagytuk, majd 20 percig 13000 rpm-en centrifugáltuk. Ez után leöntöttük a felülúszót, és 250 µl 70%-os etanolt tettünk mindegyik Eppendorf csőbe, majd további 10 percig centrifugáltuk 13000 rpm-en. Centrifugálás után a felülúszót ismét leöntöttük, és a csöveket 30 percre vákuumcentrifugába helyeztük. A folyamat végeztével a minták készen álltak a postázásra.

4.3 Sejtenyészetek

A feltételezett fertőző ágensek izolálását sejtenyészeteken kívántuk megkísérelni a fertőzött egyedek különböző szerveinek sterilre szűrt homogenizátumát felhasználva. A vírusszaporításhoz célirányosan tokhal-specifikus SSO-2 (Siberian Sturgeon Organs-2) és WSS-2 (White Sturgeon Spleen-2) sejtvonalakat alkalmaztuk (Hua és Wang, 2005; Shchelkunov és mtsai, 2009).

4.3.1 A sejtek előkészítése a fertőzésre

Munkánk során a két feljebb említett sejtvonalat alkalmaztuk. A sejteket 25 cm²-es flaskákban helyeztük el, és 20 °C-on inkubátorban tároltuk. Az SSO-2 sejtvonalhoz M199 médiumot, a WSS-2-höz MEM-et (minimal essential medium) használtunk. Passzáláskor 5 ml PBS-sel öblítettük le a sejteket, majd 2 ml tripszinnel oldottuk le azokat a flaska faláról. Az átoltáshoz annyi ml médiumot használtunk, ahány felé osztottuk a sejteket, ez általában három, ritkábban két 25 cm²-es flaskát jelentett. Nagyjából 2 hétig lehetett őket tárolni, utána elkezdtek

pusztulni. Amikor már elég gyorsan osztódtak a sejtek, ami azt jelenti, hogy nagyjából 2 nap alatt benőtték a flaskát, akkor lehetett őket plate-re rakni, ahol a sejtek fertőzésére került sor.

4.3.2 A minták előkészítése

A sejtek fertőzéséhez a TS lépét és a tumor mintát használtuk. A fagyasztóból kivéve szobahőmérsékleten hagytuk kiolvadni. Ez után kimértünk egy 50 és 100 mg közötti darabot, a lépdarab 80 mg, a tumor 70 mg lett. A mintákat külön-külön mozsárba tettük, és homokot adtunk hozzá, majd addig dörzsöltük, amíg egy egységes masszát kaptunk. Ezt követően M199 hozzáadásával hússzorosára hígítottuk az elegyeket, és 2 ml-es Eppendorf csövekbe helyeztük, amiket 2000 g sebességgel 10 percig centrifugáltunk. A felülúszót felszívtuk egy steril fecskendőbe, és fecskendőszűrőn (pórusméret: 0,22 μm) átnyomtuk a folyadékot. Az így nyert, reményeink szerint vírusokat tartalmazó, de baktériumoktól mentes folyadékból tízszeres hígítási sort készítettünk úgy, hogy 900 μl M199-hez 100 μl -t adtunk a korábban nyert folyadékból, majd ebből a csőből 100 μl -t átmértünk a következő csőbe, ami szintén 900 μl médiumot tartalmazott. Ezt a lépést még egyszer megismételtük, így összesen 4 hígításunk lett. Minden csőbe 30 μl Penicillin-Streptomycin keveréket helyeztünk, az esetlegesen előforduló baktériumok elpusztítása céljából.

4.3.3 A sejtek fertőzése

A fertőzéshez az SSO-2 sejteket 24 lyukú plate-re raktuk. Ennek a folyamatnak az eleje megegyezett a passzálással. Ezt követően a flaska tartalmának 2/3-át egy 24 ml médiumot tartalmazó Falcon csőbe tettük és elegyítettük azzal, majd a plate-en minden lyukba 1 ml folyadékot tettünk. Ebben a formában egy napig pihentettük az inkubátorban, hogy a sejtek jól meg tudjanak tapadni. Másnap pipettával leszívtuk a felülúszót, és a mintákat tartalmazó elegyekből 200 μl -t mértünk a sejtekre. Egy órát állni hagytuk, hogy a vírusok be tudjanak jutni a sejtekbe, majd újra leszívtuk a felülúszót, és 1 ml médiumot raktunk a sejtekre. Negatívnak azokat a wellket neveztük, amiket nem manipuláltunk, kétszeresen negatívak pedig, azok a wellk voltak, ahol a leszívást és feltöltést ugyan úgy elvégeztük, mint a fertőzni kívánt lyukaknál, csak médiummal és nem a mintákkal tettük ezt. Ez után minden nap fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk, és megfigyeltük az változásokat.

4.3.4 További próbálkozások

21 nappal később, amikor a sejtek már elpusztultak, így az esetlegesen bennük lévő vírusok már kiszabadulhattak belőlük, az első plate hússzoros hígításairól leszívtuk a folyadékot, azt 10 percig 2000 g-n centrifugáltuk, majd a felülúszót tovább használtuk. A lép és a tumor mintából is készítettünk egy tízszeres hígítást, így lett egy hússzoros és egy kétszázszoros hígítású minta. Mindegyik mintát két wellbe raktuk, és negatív kontrollként ismét médiumot használtunk. Ekkor is az SSO-2 sejtvonalat alkalmaztuk. Minden nap fénymikroszkóp alatt vizsgáltuk. Miután a sejtek előregedtek a plate-et $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra fagyasztottuk.

A harmadik alkalommal SSO-2 és WSS-2 sejteket is használtunk. Az új sejtvonálnak köszönhetően újra próbálkoztunk az első passzálás termékeivel, illetve második passzálást is végeztünk. Az első passzálás során nyert folyadékból már csak annyi maradt, hogy mindegyik wellbe $100\text{ }\mu\text{l}$ -t raktunk, a második passzálás során nyert folyadékból a szokásos $200\text{ }\mu\text{l}$ -t alkalmaztuk. Ez alkalommal is két wellt fertőztünk mindegyik mintával.

5 EREDMÉNYEK

5.1 Daganatok jelenléte magyarországi állományokban

Kitartó próbálkozásaink során a telefonos kapcsolatfelvételre összesen egy telepet találtunk, ahol korábban észleltek 1-2 olyan egyedet, amelyen daganat jelentkezett. A többi helyen saját bevallásuk szerint tumoros egyedek nem észleltek, vagy nem volt jelen. Ezek alapján kijelenthetjük, hogy a magyarországi akvakultúrák körülmények között tenyésztett tokhalállományokban daganatos megbetegedés igen ritkán fordul elő.

5.2 A PCR vizsgálatok eredményei

5.2.1 Gélelektroforézis értékelése

Hanson

Meglepő módon a negatívnak vélt TE10 lép és vese minták esetében is az 500 bp magasságában jelentős vastagságú csíkot észleltünk. A negatív kontroll ténylegesen negatívnak bizonyult. A későbbiekben az anyag és módszer részben említett mintákon is elvégeztük a reakciót, ezek közül a TS összes mintája és a Holland tok mutatott pozitívítást. Legtöbbször a TE10 lép mintát használtuk pozitív kontrollnak. Tekintettel arra, hogy nem az összes minta lett pozitív, kizárhatjuk annak az esélyét, hogy a Nukleázmentes víz vagy a primerek, esetleg az enzim fertőzött lehetett.

Tok Pol

A Hanson primerek alkalmazása során kapott termékek részletesebb vizsgálata céljából készült ez a primer pár. A vizsgált minták közül a KB lapátorrú tok, a TS lépe és tumorja, a Holland tok, a TN3 lépe és a harcsa DNS mutatott egyezést a pozitív kontrollal.

Tok irido

Az összes vizsgált minta pozitívnak bizonyult a gélkép alapján.

Cyprinid herpesz

A próba során három különböző primer párt alkalmaztunk, hogy átfogóbb képet kaphassunk. A reakció során a negatív kontroll nem lett negatív, ezért még kétszer elvégeztük azt. A második alkalommal a nukleázmentes vizet, a harmadik alkalommal az enzimet cseréltük ki újonnan bontottra, azt feltételezve, hogy valamelyik korábbi munka során fertőződhetett. Mindhárom

alkalommal ugyan azt a gélképet kaptuk eredményül, ezért nem dolgoztunk tovább ezekkel a primerekkel. A későbbiekben az enzim használatát is kerültük.

Aci és Ic

A formalinos tok minták, sajnálatos módon, negatívak lettek. A többi minta közül sok pozitivitást mutatott, ezek a következők voltak: TS máj, lép, tumor Aci in, TE10 lép Aci in, Holland tok Aci in, TS tumor Ic in, Akasztó 2.p Ic in.

Circovírus

Mindegyik minta pozitívnak bizonyult. A TF májból a PCR terméket tisztítottuk ki, a többit a gélből vágtuk és tisztítottuk ki. Ez után elvégeztük a szekvenáló reakciót és a kicsapást, majd elküldtük szekvenálásra.

Bár a circovírusokkal végzett próbák kezdetben kedvező kimenetelűnek látszottak, a szekvenciák egyeztetése után ismét kiderült számunkra, hogy a képződött termékek nem egyeznek megfelelő százalékban egyetlen ismert vírussal sem.

Lymphocystis disease vírus, Aquareovírus, Retrovírus

A gélképek alapján, a pozitív kontrollok kivételével, az összes minta negatívnak bizonyult, így további vizsgálatokat nem folytattunk ezen primerek alkalmazásával.

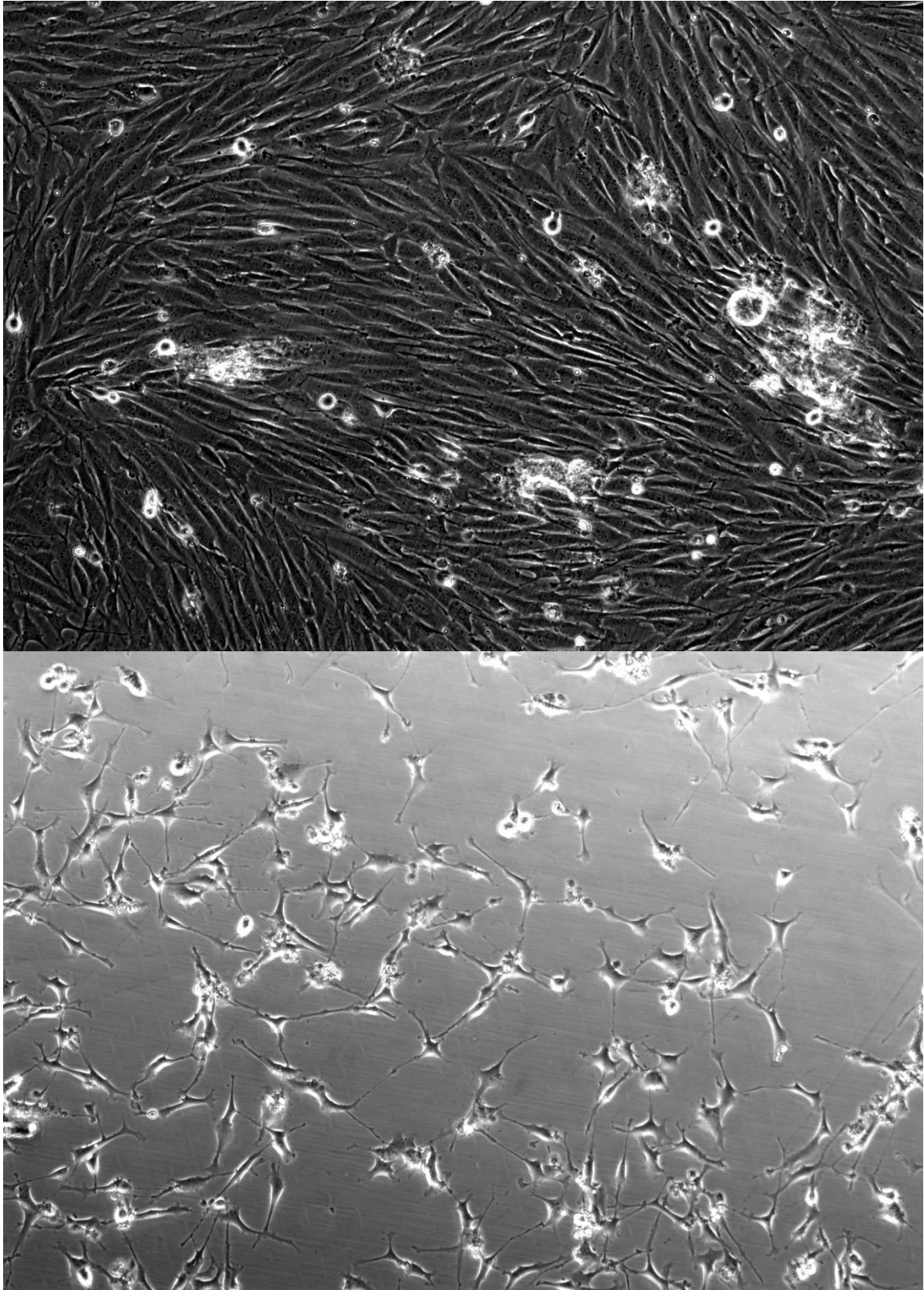
5.2.2 A szekvenálás eredményének értelmezése

Bármely minta bármely primerrel folytatott vizsgálatáról elmondható, hogy pozitív eredményre nem vezetett. A Szegedről visszakapott szekvenciák vizsgálata során arra jutottunk, hogy nem mutattak megfelelő mértékű egyezést az ncbi adatbázisban található vírusok, illetve fehérjék származtatott nukleotid sorrendjével.

5.3 Sejtenyésztés

Az először fertőzött SSO-2 sejtek közül a hússzoros hígítású lép, illetve tumor mintával fertőzött welleken a sejtek elkezdtek pusztulni (lekerekedtek, elvékonyodtak) (5. kép). A nagyobb hígítások esetén jelentős elváltozást nem észleltünk. A sejtenyészeteken végzett fertőzési kísérletek korai fázisaiban tapasztalt sejtpusztulásokat (CPE – cytopathogenic effect) nem sikerült passzálassal tovább örökíteni, így a korábban megfigyelt jelenséget nem vírusok jelenlétének, hanem a szervekből felszabaduló citopatogén anyagok hatásának nyilvánítottuk. Mindent összevetve a sejtenyészeteken egyetlen ismert vírus jelenlétét sem tudtuk igazolni.

5. kép: A felső ábrán egy negatív, míg az alsón egy 20x-os hígítású tumor mintával fertőzött SSO-2 sejtenyészeten jelentkező cytopatogén hatás látható.



6 MEGBESZÉLÉSEK, KÖVETKEZTETÉSEK

Ma Magyarország aktívan részt vesz a tokhalak akvakultúrák körülmények között történő termelésében. Leggyakrabban a – kutatásunk alkalmával is vizsgált – lénai tokot (*Acipenser baerii*) tenyésztik jó alkalmazkodó- és téteményképessége miatt. Kutatásunk célja a tokhalakon található daganatokból és/vagy szerveikből vírusok kimutatása, és így a vírusos háttér bizonyítása volt.

A vizsgálataink alapját adó dunántúli halgazdaságban nevelt különböző korú lénai tok (*Acipenser baerii*) állományokban 2016 őszén tömegesen megjelenő, majd idővel visszafejlődő daganatos elváltozások vírusfertőzés fennállásának gyanúját keltették. A szakirodalomban több helyen említik a daganatok regresszióját (Anders és Yoshimizu, 1994; Coffee és mtsai, 2013), így véleményünk szerint az a tény, hogy a daganatos egyedek már nincsenek jelen (elpusztultak) vagy a tumorok visszahúzódtak még inkább valószínűsíti a vírusos hátteret.

Számunkra a PCR technika segítségével történő vírus felszaporítás, majd genom szekvenálás, és a sejtvonalakon végzett fertőzési kísérletek bizonyultak a legkézenfekvőbb módszereknek a vírusok detektálására.

PCR vizsgálataink alkalmával egyetlen kérdéses eredményünk volt, a többi esetén a visszakapott szekvenciák alapján egyértelműen ki tudtuk zárni a keresett vírusok jelenlétét. A kérdéses eredményünk a Hanson primerek alkalmazása során gyakran előforduló, egy körülbelül 500 bp méretű termék volt, ami leginkább hal szekvenciákra hasonlított, így mellékterméknek bizonyult. Feltételezéseink szerint ez származhatott magából a halból, lehetett a genomba beépült vírus szakasz vagy a takarmánnyal elfogyasztott állati eredetű szekvenciák. Ez utóbbit tartottuk legvalószínűbbnek, hiszen a tokhalak már igen fiatal példányai is ragadozó életmódot folytatnak, így táplálékuk részét képezik a különböző halfajok lárvái, ivadékai (Tokhalakról, e. n.).

A sejtenyészeteken végzett vizsgálatok kezdetben kedvezőnek bizonyultak, de a további kísérletek, arra mutattak rá, hogy az első eredmények nem vírusok jelenlétének, hanem a szövetekből származó anyagok cytopatogén hatásának voltak köszönhetőek (Borzák Réka személyes közlés).

Továbbá, munkánk során alkalmunk nyílt felmérni a hazai telepeken jelentkező daganatok előfordulásának gyakoriságát. A rendelkezésünkre álló adatok alapján, arra az eredményre jutottunk, hogy tumoros egyedek eddig csak a nyugat-magyarországi régió két telepén fordultak elő, és ott is ritkán. Az egyik halgazdaságban 2016 őszétől 2017 tavaszáig voltak jelen a daganatos egyedek, a másik telepen egy tumoros tokhalat észleltek 2017 tavaszán.

7 ÖSSZEFOGLALÁS

A daganatos megbetegedések nem új keletűek az orvoslás történetében. A humán daganatos megbetegedésekre vonatkozó, valószínűleg első írásos emlék a III. dinasztia-beli Dzsószer fáraó szolgálatában álló, ókori tudós, Imhotep főpap feljegyzése az i. e. 27. századból.

Az állatorvoslásban a tumorok felismerése és jellemzése ennél jóval később történt meg. Az egyik első tudományos dokumentáció, amely a halak daganatos megbetegedésekben való érintettségét írja le 1793-ból származik. Az értekezés a csontok tumoros elváltozásait taglalja.

Az alábbiakban tárgyalandó vizsgálataink alapját egy dunántúli halgazdaságban nevelt különböző korú szibériai vagy más néven lénai tok (*Acipenser baerii*) állományban 2016 őszén tömegesen megjelenő, majd idővel visszafejlődő daganatos elváltozások adták. A jelenség, a szakirodalmi adatok tükrében, vírusfertőzés fennállásának gyanúját keltette.

Az eset hátterének tisztázása érdekében, munkánk során 11 friss, mélyfagyasztott vagy formalinnal tartósított egyed összesen 23 szervmintáját (kopolytú, máj, lép, vese, tumor, és szív) vizsgáltuk molekuláris és klasszikus vírusizoláló technikákkal. A molekuláris munkálatokhoz a szervekből, kommerciális kíttek eljárásait követve, genomiális DNS-t és RNS-t egyaránt izoláltunk.

A különböző, tumorképződéssel kapcsolatba hozható vírusok kimutatását (DNS vírusok: (ds) herpesz-, adeno- irodovírus, és (ss) cirkovírus; valamint RNS vírusok: (ds) aquareovírus, és (ss) retrovírus) PCR technika segítségével igyekeztünk megvalósítani.

A feltételezett fertőző ágensek izolálását sejttenyészeteken kívántuk megkísérelni a fertőzött egyedek különböző szerveinek sterilre szűrt homogenizátumát felhasználva. A vírusszaporításhoz célirányosan tokhal-specifikus SSO-2 (Siberian Sturgeon Organs-2) és WSS-2 (White Sturgeon Spleen-2) sejtvonalatokat alkalmaztunk.

A PCR vizsgálatok során felsokszorosításra került számos, kívánt mérettartományba eső, DNS szakasz került szekvencia meghatározásra, azonban ezek egyike sem mutatott megfelelő mértékű hasonlóságot a National Center for Biology Information adatbázisában megtalálható vírus gének nukleotid- és/ vagy fehérjék származtatott aminosav sorrendjével.

A sejttenyészeteken végzett fertőzési kísérletek korai fázisaiban tapasztalt sejtpusztulásokat (CPE – cytopathogenic effect) nem sikerült passzálassal tovább örökíteni, így a korábban megfigyelt jelenséget a szervekből felszabaduló citopatogén anyagok hatásának nyilvánítottuk.

Összességében, az hogy a fenti vizsgálatok során a mintákban egyetlen ismert vírus jelenlétét sem tudtuk igazolni, nem zárja ki ezen ágensek jelenlétét. Hiszen a vírusok szerepe a

daganatok indukálásában számos, az irodalomból ismert, esetben bizonyított. Így jelen témában is a további vizsgálatok elvégzése és egyéb, új módszerek alkalmazása javasolt.

8 SUMMARY

Tissue distortions manifested by tumours have been known to mankind since ancient times. The earliest official record about human tumours may be a note of Imhotep, who was the high priest of Ra sun-god and served for Djoser belonged to the Third Dynasty of Egyptian Pharaohs, in the 27th century BC.

The particular description and registration of animal tumours have become relevant just in the Modern Period of human history. One of the first scientific documentation that reported about bone tumours in fish was published in 1793.

Our study is based on the case of a fish farm located in western Hungary, where on the body surface of fish in the Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) stock, tumours had developed then disappeared. The progress of the disease, in account the literature data, took suspicion of virus infection proposed.

In our work, we studied totally 23 tissue samples excised from liver, spleen, kidney, tumour, heart and gills of 11 fish, which were moribund or conserved by frozen or in formalin.

For the molecular works, we isolated both genomic DNA and RNA from the specimens using commercial kits according to the manufacturers' instructions. We wanted to detect different tumour associated viruses (DNA viruses: (ds) herpes-, adeno-, irodovirus, and (ss) circovirus; as well as RNA viruses: (ds) aquareovirus, and (ss) retrovirus) by classical and reverse-transcription-coupled-PCR methods.

We attempted to isolate the presumable infectious agents by artificial infection of cells using the filter-sterilized tissue homogenate of studied fish's organs. For the virus propagation, we used sturgeon- specific cell lines, such as SSO-2 (Siberian Sturgeon Organs-2) and WSS-2 (White Sturgeon Spleen-2).

In the PCR assays, several DNA bands in the expected fragment size-range were managed to multiply. Nevertheless, during the sequencing, none of them presented significant similarity with nucleotide- or predicted amino acid sequences of any known virus genomes in the database of the National Center for Biotechnology Information.

Although we detected a cytopathogenic effect on the cell lines in the initial stage of in vitro infections, it was not able to transfer to following passages. Thus the cell destruction observed us earlier may be considered a result of the effect of the cytopathogenic substances released from the organs.

In conclusion, the fact that we did not manage to isolate any known viruses during our executed trials; it does not exclude the presence of these agents. The role of viruses in the

induction of tumour formation and progression is known and proven in many cases, in accordance with literature data. Therefore, further studies on this topic applying by new methods are required.

9 KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőmnek, Borzák Rékának szeretnék köszönetet mondani, aki megtanított a laboratóriumban elvégzendő feladatok menetére, lebonyolította a mintagyűjtést, és végtelen türelemmel segítette munkámat az egy év alatt.

Köszönöm Dr. Baska Ferencnek, aki a témát ajánlotta nekem, és munkám során mintákkal és értékes információkkal látott el.

Továbbá szeretném megköszönni az MTA ATK ÁOTI Halkórtan és parazitológia munkacsoport tagjainak, hogy minden kérdésemre készségesen válaszoltak, amikor Réka nem volt ott, különösképpen Selleyi Boglárkának, aki a dolgozat megírásában is segítségemre volt.

Végül szeretnék köszönetet mondani a családomnak, páromnak és barátaimnak, hogy ez alatt az idő alatt is támogattak és türelmesek voltak velem.

IRODALOMJEGYZÉK

Anders K., Yoshimizu M., 1994: Role of viruses in the induction of skin tumours and tumour-like proliferations of fish. *Diseases of Aquatic Organisms*, évf. 19, o. 215-232.

Coffee L. L., Casey J. W., Bowser P. R., 2013: Pathology of Tumors in Fish Associated With Retroviruses: A Review. *Veterinary Pathology*, évf. 50, sz. 3, o. 390-403.

Doszpoly A., Shchelkunov I. S., 2010: Partial Genome Analysis of Siberian Sturgeon Alloherpesvirus Suggests Its Close Relation to AciHV-2 – Short Communication. *Acta Veterinaria Hungarica*, évf. 58, sz. 2, o. 269-274.

Doszpoly A., Papp M., Deákné P. P., Glávits R., Ursu K., Dán Á., 2015: Molecular detection of a putatively novel cyprinid herpesvirus in sichel (*Pelecus cultratus*) during a mass mortality event in Hungary. *Archives of Virology*, évf. 160., sz. 5., o. 1279-1283.

Halami M. Y., Nieper H., Müller H., Johne R., 2008: Detection of a novel circovirus in mute swans (*Cygnus olor*) ba using nested broad-spectrum PCR. *Virus Research*, évf. 132., sz. 1-2., o. 208-212.

Hanson L. A., Rudis M. R., Vasquez-Lee M., Montgomery R. D., 2006: A broadly applicable method to characterize large DNA viruses and adenoviruses based on the DNA polymerase gene. *Virology Journal*, évf. 3., sz. 28. [PDF] URL: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles?query=A+broadly+applicable+method+to+characterize+large+DNA+viruses+and+adenoviruses+based+on+the+DNA+polymerase+gene&volume=&searchType=&tab=keyword> Letöltve: 2018. 10. 08.

Hua Y., Wang D., 2005: A review of sturgeon virosis. *Journal of Forestry Research*, évf. 16, sz. 1, o. 79-82.

IUPAC nucleotide code. URL: <https://www.bioinformatics.org/sms/iupac.html> Megtekintve: 2018. 10. 04.

Javier R. T., Butel J. S., 2008: The History of Tumor Virology. *Cancer Research*, évf. 68, sz. 19, o. 7693-7706. [PDF] URL: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/68/19/7693>. Letöltve: 2018. 09. 30.

"NEPTUN" Haltermelő és Feldolgozó Ipari és Kereskedelmi Betéti Társaság: A tokhalakról és a kaviárról. URL: <https://sturgeon.hu/> Megtekintve: 2018. 10. 01.

Qiagen, 2009: TissueLyser LT Handbook. [PDF] URL: <https://www.qiagen.com/at/resources/resourcedetail?id=eb067bcc-0638-4f75-bf00-b54094d858fe&lang=en> Letöltve: 2018. 02. 02

Rodríguez D., Bastida R., Olsson P.-E., 2002: DNA extraction from formalin fixed franciscana tissues. *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, évf. 1, sz. 1, o. 123-128. [PDF] URL: https://www.researchgate.net/publication/266739035_DNA_extraction_from_formalin_fixed_franciscana_tissues Letöltve: 2017. 12. 07.

Ron M., Verner N., Feldmesser E., Hochman D., Band M., Shani M., 1996: Amplification of Divergent Retroelements by PCR. *BioTechniques*, évf. 20., sz. 4., o. 608-612.

Seng E. K., Fang Q., Lam T. J., Sin Y. M., 2004: Development of a rapid, sensitive and specific diagnostic assay for fish *Aquareovirus* based on RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, évf. 118, o. 11-122.

Shchelkunov I. S., Shchelkunova T. I., Shchelkunov A. I., Kolbassova Y. P., Didenki L. V., Bykovsky A. P., 2009: First detection of a viral agent causing disease in farmed sturgeon in Russia. *Disease og Aquatic Organisms*, évf. 86., o. 193-203.

Thermo Fisher Scientific Inc., 2013: Product Information, Thermo Scientific RevertAid H Minus First Atrand cDNA Synthesis Kit. [PDF] URL: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1631> vagy https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012717RevertAid_H_Minus_FirstStrand_cDNA_SynUG.pdf Megtekintve: 2018. 02. 11.

Varga M.: Mióta van velünk a rák? URL: <http://immunmedical.hu/2017/03/20/914/>. Megtekintve: 2018. 09. 14.

4. melléklet Konzulensi ellenjegyzés

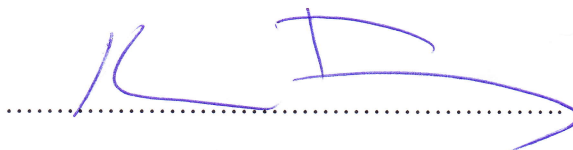
Alulírott Dr. Baska Ferenc..... Igazolom, hogy

Józsa Emőke..... (a hallgató neve)

Intenzíven tenyésztett tokfélék feltételezetten vírusos eredetű
daganatai

című diplomamunkát ismerem, azt beadásra és védésre alkalmasnak tartom.

Budapest, 2019. november 14.



a témavezető neve és aláírása

Exotikusállat- és Vad-
egészségügyi Tanszék

tanszék

Nyilatkozat a TDK és a diplomamunka azonosságáról

Alulírott JÓZSA EMÖKE..... nyilatkozom, hogy diplomamunkám,
melynek címe Intenzíven tenyésztett tokfélék
feltételezetten vírusos eredetű daganatai
tartalmi és formai szempontból teljes mértékben megegyezik az azonos című, a 2018
évi TDK konferencián szerepelt dolgozatommal.

Budapest, 2019 november 20.

JÓZSA EMÖKE
Józsa Emöke

a hallgató neve és aláírása

HuVetA
ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: JÓZSA EMŐKE
Elérhetőség (e-mail cím): jozsalmoke94@gmail.com
A feltöltendő mű címe: Intenzíven tenyésztett tokfélék
..... feltételezetten vírusos eredetű daganatai
A mű megjelenési adatai: 2019
Az átadott fájlok száma: 2

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédelemmel PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyezik, hogy a HuVetA egynél több (csak a HuVetA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy az átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyagrész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban -ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- az Állatorvostudományi Egyetem belső hálózatára (IP címekre) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

Kérjük, nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:

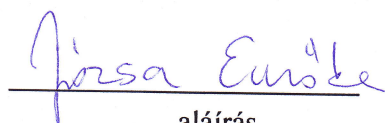


Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénytörő módon visszaélne.

Budapest, 2019. év november hó ...20...nap



aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetAMagyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive az Állatorvostudományi Egyetem Hutýra Ferenc Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett egyetemi és szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltatassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvostudományi Egyetem és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*