

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS

TOKODYNÉ SZABADI NIKOLETT

GÖDÖLLŐ

2024



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

TYÚKOK FIATALKORI HŐKEZELÉSÉNEK HATÁSÁRA
LÉTREJÖVŐ HŐSTRESSZ INDUKÁLTA MIKRORNS-EK
EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

DOI: 10.54598/004360

Készítette
TOKODYNÉ SZABADI NIKOLETT

GÖDÖLLŐ

2024

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudományok

vezetője: Prof. Dr. Szabó András
MTA doktora, Tanszékvezető, Egyetemi tanár
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élettani és Takarmányozástani Intézet
Élettani és Állategészségügyi Tanszék

Témavezető: Dr. Gócza Elen
MTA levelező tagja, Tudományos tanácsadó
Tanszékvezető
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Genetika és Biotechnológia Intézet
Állatbiotechnológia Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	7
2. Célkitűzések	10
3. Irodalmi áttekintés	11
3.1. A kutatási téma aktualitása	12
3.2. Hőstressz hatása a házityúk szervezetében	13
3.3. Hőstresszel szembeni védekezés közvetlen és közvetett alternatívái	16
3.3.1. A hőkezelés és hőstressz genetikai markerei	18
3.3.1.1. Hősokkfehérjék és hősokkfaktorok	18
3.3.1.2. A mikroRNS-ek (miRNS)	19
3.4. Házityúk esetében alkalmazható <i>in vitro</i> génmegőrzés	23
3.4.1. Ősivarsejt tenyészetek karakterizálása	26
3.4.2. PGC-k a biotechnológiai kutatás modellrendszerei	27
4. Anyag és módszer	29
4.1. A házityúk kísérleti állomány tartása és hőkezelése	29
4.2. PG sejtek gyűjtése, tenyésztése	32
4.3. PG sejtek karakterizálása	33
4.3.1. Nekrózis mérése	33
4.3.2. Proliferációs teszt <i>CLARIOstarR Microplate Reader</i> rel	34
4.3.3. Proliferációs teszt <i>ImageXpress Micro XLS</i> -sel	35
4.3.4. Immunfestés	36
4.4. RNS izolálás és cDNS írás	37
4.5. RNS szekvenálás	38
4.6. Real-time PCR	39
4.7. DNS izolálás	40
4.8. Teljes genom biszulfid szekvenálás és metilációs mintázat elemzés	40
4.9. Statisztikai analízis	41
5. Eredmények és azok megbeszélése	42

5.1. Szülői generáció molekuláris biológiai vizsgálata.....	42
5.2. Utód generáció molekuláris biológiai vizsgálata.....	48
5.2.1. PGC vonalak alapításának sikeressége a hőkondicionálás függvényében	50
5.2.2. Tenyésztési körülmények optimalizálása a PGC karakterizálásának visszaigazolásával	51
5.2.3. A mikroRNS gátlás hatása PGC-kben	54
5.2.4. Hőkezelt háztyúkocok embrióiból alapított PGC-k molekuláris diagnosztikai felhasználása a jelátviteli útvonalak feltárásához	58
6. Következtetések és javaslatok.....	64
7. Új tudományos eredmények	70
8. Összefoglalás	71
9. Summary	73
10. Mellékletek	75
11. Publikációk	92
11.1. A disszertáció témaköréből megjelent publikációk	92
11.2. A disszertáció témakörén kívüli publikációk.....	94
12. Köszönetnyilvánítás	95

Rövidítések jegyzéke

3'UTR	3' nem-transzlálódó régió
CCK-8	Sejt számláló Kit-8 (<i>Cell Counting Kit-8</i>)
CpG	DNS citozin- guanin dinukleotid
CVH	Házityúk VASA homológ (<i>chicken VASA homologue, DEAD-box helicase 4</i>)
DAZL	<i>deleted in azoospermia-like</i>
DMRT1	<i>Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 1</i>
DP	denaturált fehérje
DPBS	Dulbecco foszfáttal pufferelt sóoldat (<i>Dulbecco's Phosphate Buffered Saline</i>)
ESC	embrionális őssejt
FAO	<i>The Food and Agriculture Organization</i>
HH	Hamburger és Hamilton féle embrionális fejlődési stádiumok
HS	hőstressz (<i>heat stress</i>)
HSE	hősokk genomi régió
HSF	hősokk faktor
HSP	hősokk fehérje (<i>heat shock protein</i>)
HTHS	hőkezelés és hőstressz (<i>heat treatment and heat stressed</i>)
IPCC	Éghajlat-változási Kormányközi Testület (<i>Intergovernmental Panel on Climate Change</i>)
iPSC	indukálható pluripotens őssejt
MATE-GBI	Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet
miRNS	mikroRNS-ek
MPM	rosszindulatú pleurális mezentélium
mRNS	messengerRNS
NBGK-HGI	Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ, Haszonállat-génmegőrzési Intézet
P	foszfát
P63	Egér monoklonális antitest (<i>Mouse monoclonal antibody anti-P63</i>)
PAS	perjódsav-Schiff-reakción alapuló PAS-festés
PBS	fiziológiás sóoldat
PFA	Paraformaldehid (<i>Paraformaldehyde</i>)

PGC	primordiális ivarsejt (<i>primordial germ cell</i>)
pre-miRNS	prekurzor mikroRNS
pri-miRNS	primer-mikroRNS
qPCR	<i>real-time</i> PCR
RELN	<i>Reelin</i>
RISC	RNS-indukált csendesítő komplex
RT	szobahőmérséklet (25°C) (<i>room temperature</i>)
SSEA-1	Stádium-specifikus embrionális antigén-1 (<i>stage-specific embryonic antigen-1</i>)
TG-1	<i>Transglutaminase-1 antibody</i>
VASA	DEAD-box helikáz 4 (<i>DEAD-box helicase 4, DDX4</i>)
WGBS	teljes genom biszulfid metilációs szekvenálás

1. Bevezetés

A baromfi házasítására utaló írásos emlékek Kr. e. 1400-ból valók, fogságban történő tenyésztését pedig Ázsiában és Kínában jóval korábban megkezdték, mint Európában vagy Amerikában. A mai házityúk (*Gallus gallus domesticus*) fajták eredetét korábbi vizsgálatok Indiába vezették vissza, egy közös ősből származtatták (bankivatyúk (*G. g. bankiva*)), amely a mai napig megtalálható az indiai és délkelet-ázsiai erdőkben (West & Zhou, 1989). Mivel ezek az elemzések mitokondriális DNS (mtDNS) elemzésen alapultak, amely anyai öröklődésű, nem rekombinálo DNS, korlátozott mértékben képes feltárni a *Gallus gallus* faj öt alfajának (*G. g. bankiva*, *G. g. gallus*, *G. g. spadiceus*, *G. g. jabouillei*, *G. g. murghi*) összetett demográfiáját. Ezzel szemben a teljes genom szekvenálás gyors fejlődése pontosabb információkkal szolgálhat a házasítási folyamatok evolúciós változásának feltárására. A közelmúltban az autoszomális genomra kiterjedő vizsgálat alapján a *Gallus gallus bankiva* és *G. g. gallus* korábban vált szét a másik három alfajtól, minthogy a házasítást megkezdték volna, vagyis a *G. g. domesticus* a *G. g. spadiceus* alfajból eredeztethető (Wang *et al.* 2020; Lawal and Hanotte 2021).

A baromfitenyésztés jelentősége évről évre nő az egész világon. Az ENSZ Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezet (FAO - The Food and Agriculture Organization) kimutatásai szerint a házityúkból előállított termékek uralták a piacot 2018-ban, az éves fogyasztás elérte a 114 millió tonnát ('FAOSTAT' 2023). Ezt követően az éves globális baromfihús-termelés 2020-ben elérte a 137 millió tonnát, ami a globális hústermelés 40,23%-a. A leghatékonyabb állati fehérje előállítását teszi lehetővé a baromfihús és tojástermelő ágazat. A világon a leginkább fogyasztott állati eredetű termékek a baromfitermékek, mivel nem vonatkoznak rájuk vallási vagy kulturális korlátozások (*OECD-FAO Agricultural Outlook 2020-2029* 2020). A házityúk a világ egyik legnagyobb egyedszámban tenyésztett faja, amely kulcsfontosságú gazdasági szerepet tölt be a mezőgazdasági termelésben. Fogyasztása az elmúlt néhány évtizedben növekvő tendenciát mutat. Az egyre emelkedő mennyiségi igény minőségi változásokat eredményezett a tenyésztésben és tartástechnológiában.

Ezzel szimultán napjainkban világviszonylatban növekszik a kihalással fenyegetett és kihalt fajok száma. Ez a tény egyre inkább átalakítja az emberiség szemléletét, elfogadottá vált a biodiverzitás fenntartására való törekvés, mind a

növény-, mind az állatvilágban. Ennek egyik fontos eleme a ritka gének megmentésében és megőrzésében nyilvánul meg (FAO, 2007).

Az Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) statisztikai elemzése szerint a fajták kockázati státuszának alakulása az 1990-2018 közötti időszakban úgy alakult, hogy az állatfajok 7%-a már kihalt, míg 24%-a valamelyik veszélyeztetettség státuszba sorolt. A madárfajokat tekintve ez 25%, amin belül a házityúkfajták 27%-át kritikusan veszélyeztetett kategóriába sorolták. Az elmúlt tíz évre visszamenőleg 49 tyúkfajta tűnt el véglegesen az élővilágból (FAO Report. 2019). Ennek a tendenciának a lassításához, megállításához nélkülözhetetlen hatékony génkonzerválási stratégiák kidolgozása, majd optimalizálása az eltérő fajokra, fajtákra.

A génmegőrzés lehetséges az élő populációk fenntartásával, úgynevezett *in situ* és *ex situ*, *in vivo* módszerekkel, illetve a petesejt-, és ondómélyhűtéssel, annak hosszú távú tárolásával *ex situ*, *in vitro* módszerrel.

A populációk élő állományának fenntartása lenne a legteljesebb és legtermészetesebb forma az értékes genetikai információ megóvására, azonban ez sok hátránnyal jár és a legtöbb esetben már nem is lehetséges, hiszen pont az élő populációk sérülékenysége sodorta a legtöbb fajtát a kihalás szélére. Ebből következik az, hogy kényszerhelyzetben az ivarsejtek és embrionális sejtek hosszú távú mélyhűtése teszi lehetővé a genetikai anyag megóvását, az ezekben a sejtekben tárolt információk segítségével (*ex situ*, *in vitro* módon).

A növekvő kereslet kielégítését a nagyüzemi termelés próbálja kiszolgálni (Alexandratos and Bruinsma 2012), amit az éghajlatváltozás következtében megemelkedett környezeti hőmérséklet nagy mértékben nehezít (Thornton 2010; Rojas-Downing *et al.* 2017). Az Éghajlat-változási Kormányközi Testület (IPCC, Intergovernmental Panel on Climate Change) által elfogadott éghajlati változás modellek szerint a Föld felszíni hőmérséklete 1990 és 2100 között akár 6,4°C-kal is megnőhet (IPCC 2007). A környezeti tényezők, a hőmérséklet és a páratartalom változása hatással van az állatok anyagcseréjére és a hőszabályozási mechanizmusaira. A homeosztázis fenntartása energiaigényes folyamatok összessége, amelyet a környezeti tényezők kedvezőtlen változása tovább növel, és egy határon túl az állatok elhullásához vezethet (Leinonen *et al.* 2014). Az éghajlatváltozás tehát az egyik olyan probléma, amellyel az állattenyésztési ágazatnak meg kell küzdenie a következő években. Az éghajlatváltozás okozta negatív hatások közül a hőstressz tekinthető a baromfitenyésztés legsúlyosabb környezeti stresszorának világszerte. Egy tanulmány

már 2003-ban 128-165 millió dollárra becsülte a hőstressz okozta éves gazdasági veszteséget az Egyesült Államok baromfiágazatában (St-Pierre *et al.* 2003; Lara and Rostagno 2013).

Kutatásunkban a házityúkra, mint a baromfifélék modell állatára fókuszáltunk, ahol a hőkondicionálást követően elvégeztük a szülői állományból, illetve az utód generációból származó szövetek molekuláris biológiai elemzését. A szülői generációból nyert adatok segíthetik a kezelések hatására aktiválódó molekuláris útvonalak megismerését, míg az utód generáció ősvarsejtjeinek, és az azokból létrehozott őscsírasejt vonalaknak a genetikai elemzése információval szolgálhat a generációkon átadódó öröklődési mechanizmusokról.

2. Célkitűzések

Vizsgálataim során a házityúk hőadaptációs képességének háttérében meghúzódó molekuláris folyamatok feltérképezése volt a célom. Szerettem volna megismerni olyan speciális hőkezelési eljárás hatására lezajló molekuláris mechanizmusokat, amelyek segítik a magas környezeti hőmérséklet okozta stressz következményeinek mérséklését, ezáltal javítják a kezelt baromfiállomány hőtűrő képességét.

Kutatásaim során a kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkfajta agyszöveti mintáiban megvizsgáltam a hőkezelés hatására aktiválódó védekezési mechanizmusokban szerepet játszó messengerRNS-ek (mRNS) és mikroRNS-ek (miRNS) expressziós mintázatát.

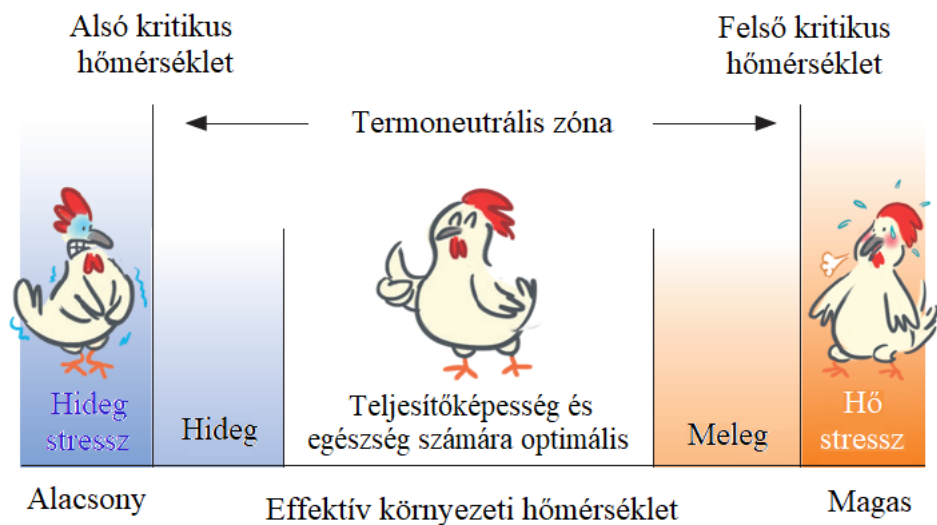
Kutatásom másik fontos eleme a primordiális csírasejtek, vagy más néven őscsírasejtek, ősvarsejtek (PGC) tanulmányozása, karakterizálása, és a létrehozott tenyészetek hosszú távú fenntartása, illetve az ehhez szükséges tenyésztési körülmények optimalizálása volt. Célom az volt, hogy a megfelelő tenyésztési paraméterek kiválasztását biotechnológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok eredményeivel is alátámasszam, és az így kialakított tenyésztési módszerekkel segítsen a házityúk génbank hatékonyabb létrehozását, fenntartását.

Hosszú távú célom a hazai génmegőrzés segítése, ősvarsejt alapú génbank létrehozása és optimális hosszú idejű tárolása házityúk esetében.

Célul tűztem ki a szülői generáción alkalmazott hőkondicionálás hatására létrejövő változások génexpressziós elemzését, valamint ezen kezelések hatására létrejövő epigenetikai változások kimutatását, azok örökölhetőségének igazolását is.

3. Irodalmi áttekintés

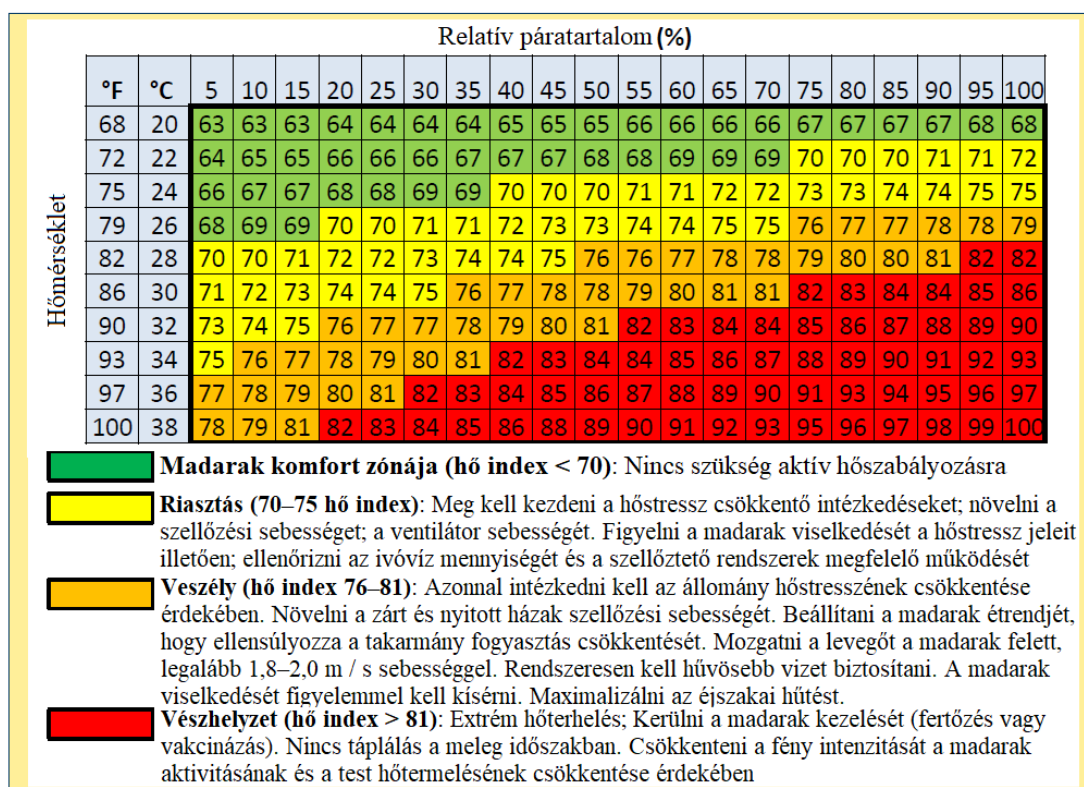
Az évtizedek óta tartó szelekció eredményeként olyan gazdaságilag jobban teljesítő fajtákat alakítottak ki, amelyek gyakran háromszor gyorsabban nőnek, mint a hagyományos fajták, nagyobb az anyagcsere aktivitásuk, de ezáltal több testhőt is termelnek, amelynek következtében érzékenyebbek lesznek a hőmérséklettől függő környezeti változásokra (Deeb and Cahaner 2002). Az ivarérett házityúk testhőmérséklete 41-42°C, nincsenek izzadság mirigyei, így érzékenyebb a magas környezeti hőmérsékletre, főleg, ha a megemelkedett hőmérséklethez magas páratartalom is társul. A madarak számára megfelelő környezet, a termoneutrális zóna 19-22°C, ebben a tartományban testhőmérsékletük állandó, normál magatartást mutatnak. Ennek a zónának a felső értékét elérve, illetve afelett egyre inkább romlik a madarak teljesítménye, míg végül a testhőmérséklet eléri az állatokra nézve letális szintet (1. ábra).



1. ábra: Termikus zónák a környezeti hőmérséklet függvényében (Geudens 2019).

A testhő csökkentése aktív folyamat, aminek egyik szereplője a párologtatási mechanizmus a bőrfelületen és légzőrendszeren keresztül. A testfelület és levegő nedvességének grádiense határozza meg a párologtatás útján történő hűtést. A magas környezeti hőmérséklet magas relatív páratartalommal kombinálva hipertermiát eredményez, amely csökkenti a táplálék felvételt és hasznosítást, a növekedést,

tojástermelést, a hús- és tojásminőséget és az állatok életképességét (Rajkumar *et al.* 2011; Xie *et al.* 2014) (2. ábra).



2. ábra: A hőmérséklet és páratartalom arányának hatása a baromfi stressz indexére (Xin and Harmon 1998).

3.1. A kutatási téma aktualitása

A kutatókat már régóta foglalkoztatja, hogy hogyan lehetne megoldani a tyúkok akklimatizálását, vagyis, hogy a hűvösebb éghajlati területeken kitenyésztett, nagyobb teljesítményű házityúkok teljesítménye ne romoljon magas hőmérsékletű környezetbe helyezve sem. A magas hőmérséklet minden szaporasági és termelési paramétert negatívan befolyásol, ezáltal súlyos gazdasági kiesést okoz, akár a húsminőségre, akár a tojásstermelés mennyiségre nézve.

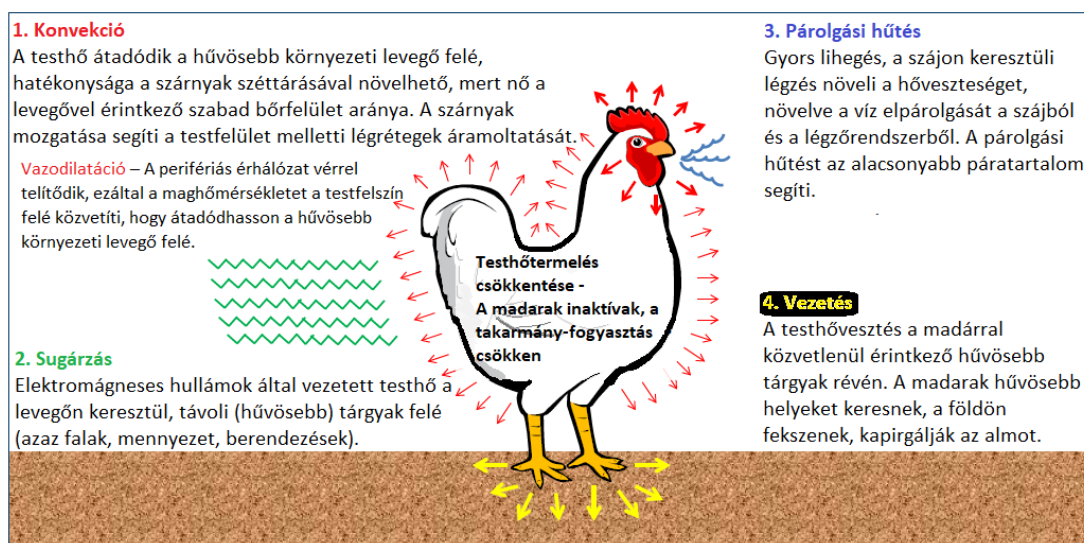
Napjainkban már számos mérsékelt övi területen igen hosszúak és forrók a nyarak, ezért a hőstressz okozta károk ma már a hazai nagyüzemek esetében is jelentősek, így a hőstressz hatására bekövetkező negatív hatások megelőzésére hazánkban is egyre nagyobb igény mutatkozik. A jövő hatékony mezőgazdaságának kialakításában nagy szerepe lesz az állatok fokozott adaptációs képességének, mivel Magyarországon is egyre nagyobb az igény a baromfitermékekre. A hőstressz az egyik legjelentősebb környezeti hatás, aminek a hazai állományok leginkább kitéttek. A

gazdasági veszteség, mind a tojás szám csökkenésében, mind a mortalitási ráta növekedésében megnyilvánul (Nawab *et al.* 2018).

Annak érdekében, hogy enyhíteni lehessen a változó klíma következményeit, a hőstressznek jobban ellenálló, illetve arra érzékeny tyúk fajták molekuláris genetikai összehasonlító vizsgálatára van szükség. Az adatok tükrében optimális fiatalkori hőkezelési módszert kidolgozva a magasabb környezeti hőmérsékletet is tolerálni képes állomány lenne kialakítható (Dunnington and Siegel 1984; Loyau *et al.* 2016).

3.2. Hőstressz hatása a házityúk szervezetében

A szervezet a belső egyensúly fenntartására törekszik. Ehhez ennek az állapotnak a felborulását okozó ingereknek a kivédése szükséges. Ha az inger nem túl erős, általános életfolyamatok mennek végbe, amit adaptációnak nevezünk (Brown 1959). Ha az inger erős, és hatására a belső egyensúly felborul, a szervezet specifikus, (pl.: immunválasz), és nem-specifikus válaszokkal reagál. A szervezet nem specifikus válaszát a testet ért nem fajlagos igénybevételekre „stresszállapotnak” nevezzük.

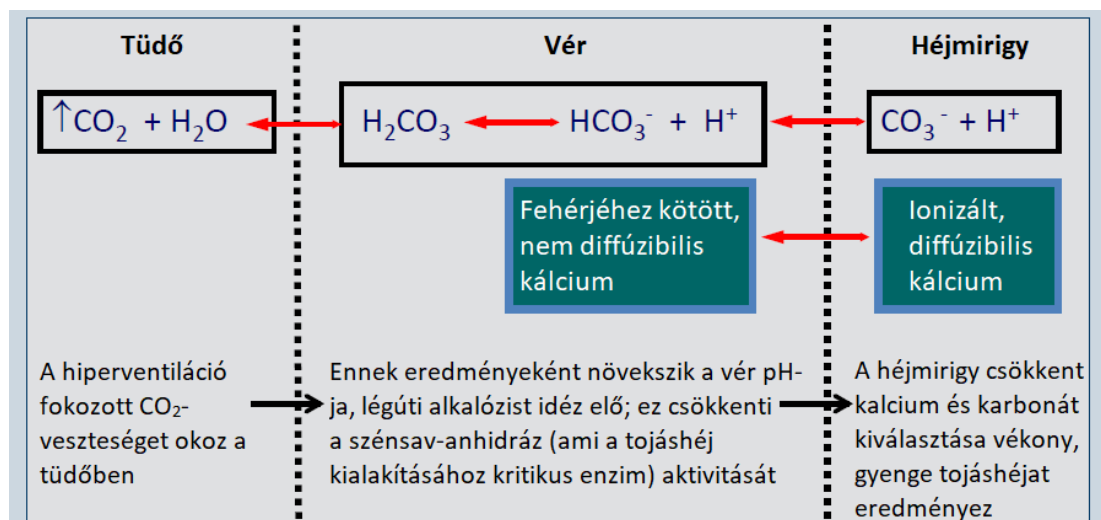


3. ábra: A házityúk hővezető mechanizmusai (Hy-Line International, 2016).

Magas környezeti hőmérsékleti körülmények között a madarak egyre több energiát fordítanak a testhőmérséklet szabályozására. A felesleges hő elvezetése négy mechanizmus révén valósul meg. A konvekció (légáramlás) során a csirkék legyeznek a levegőt, a környezet felé igyekeznek átadni a testhőt a ritkábban tollazott bőrfelület szabadon hagyásával, széttárják szárnyaikat, ezekhez szorosan kapcsolódik a perifériás vérátáramlás növelése. Sugárzással elektromágneses hullámok vezetnek a hőt

a távoli, hűvösebb tárgyak felé. Hővezetés útján a hűvösebb közeg keresésével és közvetlen érintkezéssel hűtik magukat. A madarak kaparják a földet, almot és fekszenek, ezzel megnövelve az érintkező felületet. Fontos még a párologtatás az úgynevezett lihegés, de ez csak akkor hatásos, ha nem túl magas a páratartalom. Nagyobb mértékű vízfogyasztás mellett a kiválasztás fokozása is szóba kerül (3. ábra).

A különböző hővesztési mechanizmusokat összekapcsoló legfontosabb elem a vér, szerepe a vazodilatációban és a passzív vízvezetés során is megnyilvánul. A kapillárisokban a véráramlás a test periferiáján növekszik, a belső szerveknél csökken (Wolfenson *et al.* 1981), lassul az emésztés, romlik a tápanyag hasznosítás. A légzési sebesség növekszik (215-235 lélegzet/perc), a plazma CO_2 szint és a sav-bázis egyensúly felborul. Ha ez a stresszt előidéző állapot hosszabb ideig fennáll az kiszáradáshoz és a vérmennyiség csökkenéséhez vezethet. A csökkent vérmennyiség megváltoztatja a vénás visszaáramlást, és a vérkeringést a felső légutakban, ami hipertermiát és végül elhullást eredményez.



4. ábra: Hőstressz indukálta sav-bázis egyensúly felborulásának ellensúlyozása (Hy-Line International, 2016).

A végbemenő fiziológiai változásokat sejtszintű károsodások kísérik, aminek következtében megjelenő szignál molekulák jelátviteli útvonalakat, neuroendokrin és molekuláris válaszokat aktiválnak. A csökkent takarmány felvétel is hozzájárul a hipotalamusz – hipofízis - mellékvese tengely aktiválódásához, ami megváltoztatja a neuroendokrin profilt. A homeosztázis felborulása a növekedés lassulásához, kevesebb tojástermeléshez és húsminőség romláshoz vezet, ugyanis növekszik a lipid peroxidáció (Babinszky *et al.* 2011), megváltozik az elektrolit egyensúly, gyengül az emésztés, csökken a plazmafehérje és a kalcium szint (Lin *et al.* 2006). A madarak

képesek viszont aktív anyagcserével szabályozni a testfolyadékaik pH-ját, metabolikus savak felhalmozásával próbálják megtartani a sav-bázis egyensúly normál állapotát. A hidrogén ionok bikarbonát ionokkal kombinálva szénsavvá alakulnak, ami savas irányba tolja a közeg pH-ját, a szénsavat a szénsav-anhidráz szén-dioxidra és vízre bontja, a szén-dioxid a tüdőn, míg a hidrogén ionok a vesén keresztül ürülnek ki, és az így felszabaduló bikarbonát ionok aránya határozza meg a bázikus értéket (Ruíz-López and Austic 1993) (4. ábra).

A metabolikus alkalózis egy olyan anyagcserezavar okozta állapot, amelyben a vér a túlságosan magas bikarbonát szint miatt lúgos. A táplálékfelvétel csökkenésével kevesebb az ásványi anyagok, a nátrium és kálium felvétele, aminek szabályoznia kellene a bázisraktárakat. Emellett a megnövekedett hemodilúció (a vérplazma térfogatának megnövekedése a vörösvérsejtekhez képest) tovább csökkenti a plazma nátrium és kálium szintjét a fokozott vízfelvétel és kiválasztás útján. Légzőrendszeren keresztül, lihegés útján a csökkent vér szén-dioxid szintje vezet a bikarbonát ion túlsúlyhoz (Borges *et al.* 2004).

Mivel sok energia kell a fiziológiai válaszok végrehajtásához, az immunválasz csökken, ami a timusz, lép és máj relatív súlyának csökkenésében is megmutatkozik. Az összes keringésben lévő ellenanyag szintje alacsony, például az IgM és IgG (Felver-Gant *et al.* 2012; Ghazi *et al.* 2012). Madarakban a B sejtek a Fabricius-tömlőből (latinul *Bursa fabricii*) fejlődnek, ennek a súlyvesztését és a limfociták számának csökkenését is leírták a szakirodalomban (Aengwanich 2008). A stresszhatás alatt növekszik a kortikoid és vércukorszint. A glükokortikoid felszabadulás okozza a nyiroksejtek pusztulását, ami a limfociták számának csökkenéséhez vezet. A limfocitáknak fontos szerepe van az antitestek előállításában, hiányuk zavart okoz a kórokozókkal szembeni védőfunkciókban. Ezzel szemben a heterofil granulociták felszabadulása fokozódik a csontvelőből, de fagocitáló és baktericid aktivitásuk csökken (Berne and Levy 1998). A gyenge immunitás lehetővé teszi a vírusok, baktériumok felhalmozódását a húspanban, ami a húsmínőség romlása mellett már az élelmiszer-biztonságot is veszélyezteti (Lara and Rostagno 2013)

Hőstressznek kitett állatok szervezetében sejtszinten a legtöbb fehérjeszintézis lelassul, mert nem jut elegendő energia a növekedési mechanizmusok számára. Azonban az úgynevezett hőshock fehérjék (*heat shock protein* – HSP) közül számos szintézise magas, mivel ezek az erősen konzervált fehérjék védőfunkciókat töltenek be. Hőérzékeny fehérjékhez kötődve védik a fehérjeszerkezetet, gátolják azok

aggregálódását és lebontását. Továbbá szerepük van a citoszkeletális integritás fenntartásában és a sejtciklus szabályozásban is. Megtalálhatók az extracelluláris környezetben, ahol stimulálják az immunsejteket. A különböző szövetekben, szervekben más-más fehérje aktiválódik, a madár ivarszervekben a hímvivárú gonádokban a HSPD1 és HSPA5 fehérjék apoptotikus folyamatokban vesznek részt, a HSPA2 és HSP70 molekuláris chaperonok, a fehérjék globuláris szerkezetének kialakításával előzik meg a hibás aggregátumok kialakulását a spermatogenezisben (Wang *et al.* 2015). Tojókban a *HSP25* expressziója emelkedik meg, ami a tüszősejtek fehérjekárosodását jelzi (Cheng *et al.* 2015). A véráramlás átcsoportosítása a szervek kárára valósul meg. A *HSP70* és *HSP90* expressziójának emelkedése figyelhető meg az ileum területén (Varasteh *et al.* 2015). A *HSP70* emelkedett szintje figyelhető meg a stresszelt állatok hipotalamuszában, de a *HSP90* szintje változatlan maradt (Zhang *et al.* 2014). A máj metabolikusan aktív szerv, ennél fogva érzékenyebb a stresszre, ami a HSP-k szintjében is megmutatkozik. A máj központi szerepet tölt be a szervezetet ért behatásokra aktiválódó válaszreakciókban, az általa termelt fehérjék indítják be az anyagcsere és immunválaszokat (Chen *et al.* 2011; Park *et al.* 2019).

A szövetek között egyértelmű a HSP-k expressziójának különbsége, profilja. Ennek oka lehet a szövetek funkciójának és metabolikus aktivitásának különbsége. Valamint szembeutnő különbség mutatkozott az egyes házityúkfajták között, illetve annak függvényében, hogy a hőstressz mennyi ideig állt fenn (Murugesan *et al.* 2017).

3.3. Hőstresszel szembeni védekezés közvetlen és közvetett alternatívái

A magas környezeti hőmérséklet hatásának következtében a baromfiállományt sújtó hőstressz negatív hatásainak ellensúlyozása közvetlen fizikai úton, a tartástechnológia megreformálásával is történhet. Figyelni kell az ólak helyes kialakítására, hogy megfelelő legyen a szellőzés, kerülni kell a túlzásúfolságot és törekedni kell a megfelelő vízellátásra. A felhalmozódott szén-dioxid, ammónia és magas páratartalmú levegő kicseréléséhez a szellőzést maximalizálni kell szabályozható klímaberendezések telepítésével, azonban ez növeli a termelés költségeit. Kulcsfontosságú az ivóvíz ellátottság és annak hőmérséklete. A termoneutrális zónában a madarak víz-takarmány fogyasztása 2:1-hez arányú, ami 38°C-os környezetben 8:1-re módosul. Az itatók esetében a víz átfolyási értékének legalább 70ml/perc-nek kell lennie. Az ivóvíz alacsonyabb hőmérsékleten való tartása

(25°C alatt) pedig megkönnyíti a tyúkok belső hőmérsékletének csökkentését, javítva a víz-takarmány fogyasztás arányát (Hy-Line International 2016).

Hőstresszel szembeni ellenálló képesség javításának közvetett útja a madarak szervezetének adaptációját elősegítő takarmányozás, célzott tenyésztés bizonyos kedvező géntípusokra és a hőkondicionálás alkalmazása. Azonnali megoldást eredményez a speciális összetételű takarmánnyal való etetés, illetve az etetések idejének optimalizálása. Meleg időben az alacsony fehérjetartalmú étrend, néhány esszenciális aminosavval kiegészítve jobb eredményt ad, mint a magas fehérjetartalmú (Daghir 2009). A hőstressz növeli az ásványi anyagok és vitaminok kiválasztását, lassul azok metabolizmusa, így csökken a szérumban és a májban a vitaminok koncentrációja (Sahin *et al.* 2009). A zsírban oldódó vitaminokat a magasabb zsírtartalmú tápokhoz, míg a vízoldékony vitaminokat az ivóvízhez kell adni. Például a C-vitamin a leghatékonyabb antioxidáns, 1g/l ivóvíz adagolása javasolt (Daghir 2009). Emellett fontos még az elektrolitok pótlása is. A NaHCO₃ kiegészítés javítja a felső légúti alkalózis miatt kialakuló hidrogén-karbonát hiányt (Benton *et al.* 1998).

Számos gén befolyásolja a hőtűrést. Néhány, mint például a „kopasz nyak” (*NA*) gén domináns, ami közvetlenül befolyásolja a hőtűrést a tollborítottság csökkentésével (Cahaner *et al.* 1992, 1993), míg más gének nemhez kötötten recesszíven öröklődnek, ilyen például a törpeséget okozó (*DW*) gén, amely a csökkent testméret által csökkenti az anyagcsere termelte hőmennyiséget. A *FRIZZLE (F)* gén a tollak kifelé hajlását okozza, ami segíti a testfelszíni hőleadást, brojlerek esetében csökken a tollazat súlya (Deeb *et al.* 1993; Cahaner *et al.* 2008).

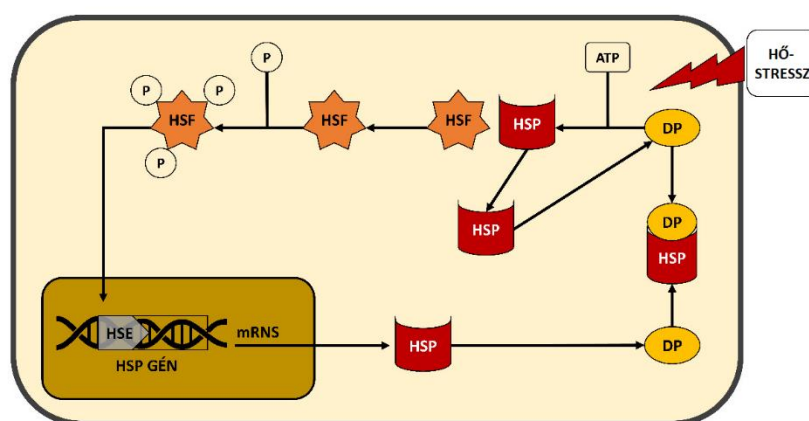
További kutatások azonban más perspektívában közelítik meg az adaptáció javítását. Egy megfelelő kezelési, hőkondicionálási eljárás kidolgozására irányulnak. Számos szakirodalom leírja a korai (fiatal/csibe korú) hőkondicionálás pozitív hatásait felnőtt korban. Ez egy rövidebb ideig tartó (12-24 óra) 36-38°C-on való nevelést jelent, aminek következtében javul a felnőtt állatok hővel szembeni ellenállóképessége (Körösiné M. A. *et al.* 2005; Lin *et al.* 2006; Szabó *et al.* 2009; Liptói *et al.* 2010; Anand *et al.* 2016). A szaporodási paramétereket tekintve a hőkondicionáláson átesett házityúkoknál szignifikánsan azok magasabbak voltak a napi tojástermelés hőstressz esetén, mint a nem hőkezelt állomány esetében. A megtermékenyített embriók aránya is magasabb volt, míg a spermiumok mennyiségére és minőségére nem volt hatással a kezelés (Tóth *et al.* 2021)

3.3.1. A hőkezelés és hőstressz genetikai markerei

A hőstresszel (*Heat stress*-HS) kapcsolt genetikai markerek azonosítása őshonos háziyúokban alátámaszthatja ezek biomarkerként való alkalmazási lehetőségét. Jól beállított hőkezelési protokoll alkalmazását követően elvégzett molekuláris biotechnológiai módszerekkel igazolhatjuk az állatok hőtoleranciáját eredményező molekuláris folyamatok elemeit.

3.3.1.1. Hősokkfehérjék és hősokkfaktorok

Számos szakirodalmi adat bizonyítja a hősokkfehérjék (*Heat shock protein*-HSP) szerepét a hőstressz indukálta jelátviteli útvonalakban (Kampinga and Craig 2010; De Maio and Vazquez 2013; Bakthisaran *et al.* 2015). A HSP-k (5. ábra) chaperonokként működnek, amelyek a HS indukálta fehérjekárosodást ellensúlyozzák azáltal, hogy megkötik a fehérjét, így megőrizve azok szerkezetét, továbbá szabályozzák a fehérjék membránokon vagy organelumokon keresztüli migrációját, a receptorokhoz való kötődést, a specifikus enzimfunkcióikat (Kampinga and Craig 2010; De Maio and Vazquez 2013).



5. ábra: A hősokkfehérjék (HSP) hatásmechanizmusának sematikus ábrája a hőstressz (HS) elleni sejtválaszban. HSF = hősokkfaktor; HSE = hősokk genomi régió; DP = denaturált fehérje; P = foszfát (Perini *et al.* 2020).

A sok HSP közül a HSP70 korrelál a legjobban a hőtoleranciával (Li and Mak 2009). A HSP90 chaperon jelen van a baktériumokban és az összes eukariótában. A HSP70 és a HSP90 is a chaperon rendszerrel együttműködve vesz részt a fehérje hajtogatásában és aktiválásában (Johnson 2012) A molekuláris chaperon aktivitáson

kívül a HSP-k részt vesznek a fehérje feltekeredésének szabályozásában, a citoskeletális integritásban és a sejtciklus irányításában is (Bakthisaran *et al.* 2015).

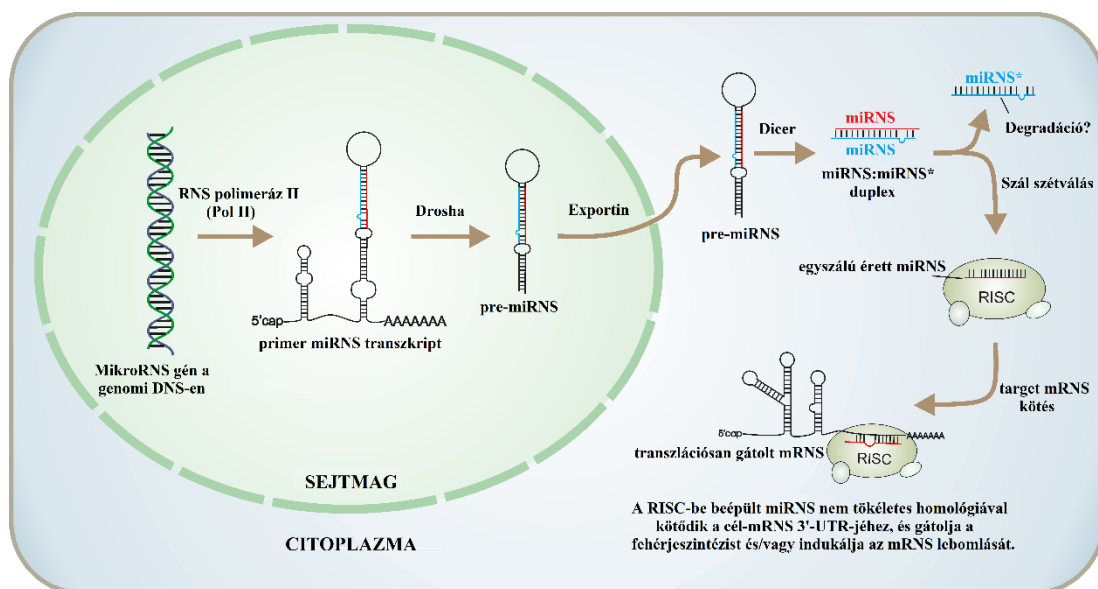
A hősokkfehérjék mellett szintén megfelelő biomarkerek lehetnek a hősokkfaktorok (*heat shock factor*-HSF). Korábbi szakirodalom szerint állatokban négy HSF található (Inouye *et al.* 2004; Xie *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014), azonban 2018-ban zebraadánióban azonosították az ötödik HSF-et (Saju és mtsai., 2018), amelyről beigazolódott, hogy nélkülözhetetlen a zebrahal spermatogenezisében. Madarakban három hősokk transzkripciós faktor (HSF) gént klónoztak és karakterizáltak, ami alapján a *HSF3* aminosavszekvenciája körülbelül 40%-ban rokon a *HSF1* és *HSF2* szekvenciájával. Mindhárom faktor szekvenciája DNS-kötő motívumokban és a hidrofób aminosav heptádokban gazdag és ezek minden eukarióta HSF-ben közösek. Ezen általános hasonlóságok ellenére minden madár HSF eltérő DNS-kötő tulajdonságokat mutat. Az *in vitro* expresszált HSF2 konstitutívan kötődik a hősokk elem promóter szekvenciájához, míg sem az *in vitro* expresszált HSF1, sem a HSF3 nem kötődik DNS-hez. A HSF1 DNS-kötődését hősokk vagy nemionos detergenssekkel végzett kezelés indukálja, míg a HSF3 DNS-kötő tulajdonságait ezek a körülmények *in vitro* nem indukálják. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a HSF3 aktiválása magában foglalhat egy indukciós útvonalat, amely különbözik a hősokk gének indukciójának eddigi formáitól. A HSF3 DNS-kötő aktivitása azonban elérhető, ha a karboxil-terminális régiót, beleértve a disztális heptád ismétlődését kivágjuk, ami negatív cisz-szabályozó szekvenciák fontosságát jelzi. A HSF3 megléte éppúgy, mint a HSF1 és a HSF2 együtt expresszálódik a fejlődés során a legtöbb szövetben, ami arra utal, hogy a HSF3-nak általános szerepe van a szabályozási útvonalakban (Nakai and Morimoto 1993). Akut hőstresszvizsgálatokban azt találták, hogy a hőkezelési idő növekedésével a *HSF3* és a *HSP70* expressziója először csökkent, majd mindkét kínai tyúkfajtánál szignifikáns növekedést mutatott. Ezek alapján a *HSF3* és a *HSP70* expressziója faj- és szövetspecifikus a hőkezelés során (Zhang *et al.* 2014).

3.3.1.2. A mikroRNS-ek (miRNS)

A mikroRNS-ek (miRNS) a genomban található kisméretű, nem kódoló RNS-ek, amelyek a transzkripció után szabályozzák a génexpressziót az mRNA lebontásával vagy a transláció gátlásával. A miRNS-ekről ismert, hogy fontos fiziológiai és patológiai folyamatokat szabályoznak (Houbavity *et al.* 2005). A miRNS-ek génjei a

genomban szétszórtan helyezkednek el: egyesek intergenikusak, míg mások intronikus vagy exonikus régiókban lokalizálódnak (Houbaviy *et al.* 2003).

A miRNS-ek biogenezeise többlépcsős folyamat fejlettebb gerincesekben. A folyamat azzal kezdődik, hogy az RNS-polimeráz II átírja ezeket a miRNS-géneket a genomi DNS-ről, hosszú (több 100-1000 nt) primer-miRNS transzkriptumokká (pri-miRNS), amelyek poliadenilezettek. Ezt a pri-miRNS-t a Drosha-ból (RNáz III típusú enzim), DGCR8-ból és spliceoszóma komponensekből álló mikroprocesszor komplex tovább hasítja a sejtmagban prekursor miRNS-sé (pre-miRNS). Az Exportin-5 enzim a pre-miRNS hajtú komplexeket a sejtmagból a citoplazmába exportálja. Ezt a pre-miRNS-t a Dicer, és a Ribonukleáz III enzim hasítja tovább a TRBP segítségével egy instabil, 19–25 nt miRNS duplexé. A duplex egy 5P és egy 3P szálból áll, majd a szelektív folyamat eredményeként a vezető RNS szál beépül az RNS-indukált csendesítő komplexbe (RISC). Az RNS interferenciával kapcsolt géncsendesítést közvetíti, ahol az érett miRNS és a cél-mRNS közötti részleges bázispárosodás a transláció gátlásához vagy az mRNS lebomlásához vezet (6. ábra). Ezen a kanonikus érési folyamaton kívül a miRNS biogenezeisének számos Drosha- vagy Dicer-független útvonala létezik (Sonkoly and Pivarcsi 2009; Winter *et al.* 2009). A miRNS-ek kulcsfontosságúak a génszabályozásban, a pluripotencia, az önmegújulás, valamint az embrionális őssejtek (ESC) és indukálható pluripotens őssejtek (iPSC) differenciálódásában (Hashemzadeh 2017).



6. ábra: A miRNS-ek bioszintézisének folyamatábrája (Sonkoly and Pivarcsi 2009).

A miRNS-ek tehát kisméretű (20-30 nukleotid hosszúságú) nem kódoló RNS-ek, amelyek a cél-mRNS-ek 3' nem transzlálódó régiójához (UTR) kapcsolódnak, ezáltal előidézve az mRNS lebomlását vagy a transzláció gátlását (He and Hannon, 2004). Egyetlen miRNS számos gén mRNS- és fehérjeszintjét befolyásolhatja, és több miRNS kötődhet ugyanahhoz az mRNS-célmolekulához, lehetővé téve a génexpresszió szabályozásának sokoldalú mintázatát. Éppen ezért a miRNS-ek az egyik felmerülő pluripotencia faktorok az össejtbiológiában (Houbaviy, Murray and Sharp, 2003; Maraghechi et al., 2013; Li et al., 2017). Alapvető szerepet játszanak a PGC-k pluripotenciájának fenntartásában (Rengaraj et al., 2011, 2013).

A különféle miRNS-ek jelentős figyelmet kapnak a neurogenesis során, valamint a neuronális fiziológia és plaszticitás későbbi aspektusaiban is, beleértve az ingerlékenységet, a szinapszis érését, a szinaptikus funkciót és a neurodegeneratív betegségeket (Coolen and Bally-Cuif 2009; Maes *et al.* 2009; Martino *et al.* 2009; Schratt 2009). A hipotalamusz funkcionális idegsejthálózatai mind a madár-, mind az emlősfajokban a késői embrionális stádiumtól a korai posztnatális időszakig fejlődnek ki (Szarek *et al.* 2010; Ishii and Bouret 2012). A pre- és korai posztnatális környezet változásai hosszútávú és potenciálisan visszafordíthatatlan következményekkel járhatnak a hipotalamusz fejlődésére és működésére (Bouret and Simerly 2006; Tzschentke 2007). Leírták a miR-138-5P szerepét a sejtmigrációban egy hipotalamusz eredetű neuronális sejtenyészetben, amelyet házityúkból alapítottak (Kisliouk *et al.* 2014). A neuronok migrációját és pozicionálását egy nagyméretű szekretált extracelluláris mátrix glikoprotein, a Reelin (*RELN*) szabályozza a fejlődő agyban. Bár a miR-138-5P sejtmigrációra gyakorolt hatása a *RELN* expresszió gátlásán keresztül specifikusnak tűnik, meg kell jegyezni, hogy a miR-138-5P különböző mRNS-ekhez képes kötni, amelyek termékei részt vesznek a sejtmigráció szabályozásában (Kisliouk and Meiri 2013; Daswani *et al.* 2022). Például kimutatták, hogy a miR-138-5P gátolja az Ezh2 metiltranszferáz expresszióját és a H3 hiszton metilációját a PO/AH 27-es lizinjénél, és befolyásolja a hőtolerancia kialakulását (Kisliouk *et al.* 2011).

1. táblázat. A hőstresszhez kapcsolódó legfontosabb gének génontológiája, két területet (molekuláris funkció és biológiai folyamat) kiemelve (Perini *et al.* 2020).

Gén név	NCBI gén azonosító	Gén család	Molekuláris funkció	Biológiai folyamat
<i>HSP70</i> <i>HSPA2</i>	423504	hősokk-fehérjék	ATP kötés; hősokkfehérje kötés; torzult szerkezetű fehérjekötés; ATPáz aktivitás	vezikula-mediált transzport; Chaperon funkció általi fehérje-hajtogatás; torzult szerkezetű fehérje indukálta sejtválasz (Shaner and Morano 2007; Brocchieri <i>et al.</i> 2008)
<i>HSP90AA1</i>	423463	hősokk-fehérjék	torzult szerkezetű fehérjekötés; fő szubsztrátjai a kinázok és szteroid receptorok	hibásan hajtogatott fehérjék újra hajtogatása (Hoter <i>et al.</i> 2018)
<i>HSF1</i> hősokk-faktor 1	420362	hősokk-fehérjék	DNS-kötő transzkripciós faktor aktivitás; szekvencia-specifikus DNS-kötés; RNS polimeráz II proximális promoteréhez való kötés	RNS-polimeráz II promoterről történő transzkripció szabályozása stresszválaszban; transzkripció pozitív szabályozása az RNS polimeráz II által (Trinklein <i>et al.</i> 2004)
Mir-138-5P	406929	mikroRNS, rövid (20-24 nt) nem kódoló RNS-ek	mRNS kötés, szekvencia specifikus mRNS kötés	génexpresszió poszt-transzkripciós szabályozása; mRNS translációs gátlása vagy destabilizációja (He and Hannon 2004; Kisliouk <i>et al.</i> 2011)

Az 1. táblázatban kiemeltem a legtöbbet vizsgált HSP-eket, HSF-t és miRNS-t, feltüntetve azokat a biológiai folyamatokat, amelyekben részt vesznek. Ezen hőstressz biomarkerek génexpressziós mintázatainak összehasonlítása segíthet megérteni az állatok hőtoleranciáját eredményező molekuláris folyamatokat (Perini *et al.* 2020).

Úgy gondolom, hogy az mRNS-ek és miRNS-ek kifejeződési mintázatában a hőkezelés hatására létrejövő változások alapján következtetni lehet az állatok adaptációs képességének háttérben meghúzódó molekuláris folyamatokra (Nakai and Morimoto 1993; De Maio and Vazquez 2013; Kisliouk *et al.* 2014; Xie *et al.* 2014; Bakthisaran *et al.* 2015).

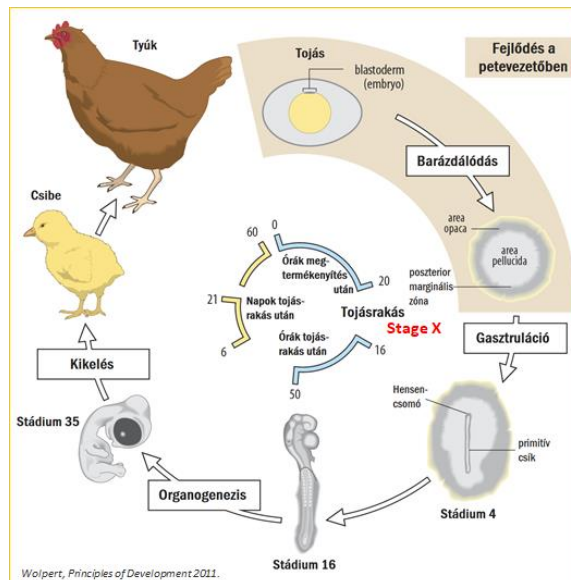
3.4. Házityúk esetében alkalmazható *in vitro* génmegőrzés

A genetikai anyag hosszú távú tárolása emlősök esetében jóval előrébb jár, mint a madaraknál, ugyanis sok faj esetében elegendő a hímivar haploid genomjának, a spermiumnak a mélyhűtött tárolása. Továbbá emlősöknél a petesejt és az embriók vitrifikációs technikával végezhető tárolása már jó hatásfokkal alkalmazható eljárás (Dobrinsky 2002; Vajta and Kuwayama 2006).

A madaraknál két fő ok akadályozza az emlősöknél kifejlesztett eljárások alkalmazását. Az egyik a hím és női ivari kromoszóma készlet egyediségéből, a másik az embriók fejlődési sajátosságából következik. A madaraknál ugyanis a női ivar a heterogamétás, ZW ivari kromoszómákkal, míg a hímivar a homogamétás ZZ ivari kromoszómákkal, tehát a spermiumok fagyasztásával csak a Z ivari kromoszóma kerül tárolásra (Végi *et al.* 2017). Az embrió fagyasztását pedig nagy mennyiségű szik teszi lehetetlenné, így a W ivari kromoszóma elvész. Egyik lehetséges irányvonal a petefészek tárolása, mivel a baromfi naposkori petefészek szerkezete és felépítése nagyon hasonlít az egéréhez (Liptoi *et al.* 2013), aminek a darabolása, génbanki tárolása, és visszaültetése régóta sikeresen alkalmazható (Dorsch *et al.* 2004). Az emlős petefészek génmegőrzési célú tárolásához vitrifikációs módszert fejlesztettek ki (Wang *et al.* 2008; Patakiné Várkonyi *et al.* 2012), amit később adaptáltak a madár petefészek tárolásához. A naposkori petefészek oogóniumokat és primer oocytákat tartalmaz, amik a petesejtek kiindulási fejlődési alakjai, tehát a szövet fagyasztásával a génmegőrzés szempontjából nélkülözhetetlen genetikai anyagot tároló sejtek is tárolásra kerülnek. Felolvasztást követően a recipiens csibébe való transzplantálás során a megtapadó petefészekben ivarérést követően a donortól származó petesejtek is termelődnek (Song and Silversides 2006; Liptoi *et al.* 2020).

A magyarországi baromfi kriobank kialakítása 2013-ban kezdődött, ahol az eddig ismertett technikákat alkalmazták, elsőként a spermafagyasztást, ami őshonos magyar baromfifajtánként 250-300 mintát jelentett (Barna *et al.* 2016). Ezt követően megkezdődött a génmegőrzés szempontjából teljesebb technikák adaptálása a

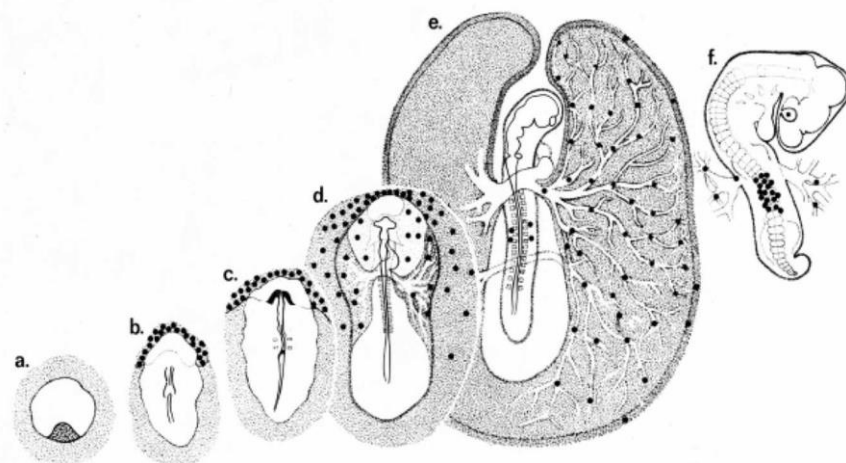
baromfik esetében. Mivel a spermiumok és a petefészek szövetekben lévő oogóniumok mélyhűtésével csak a haploid genetikai anyag tárolása valósul meg, újabb vizsgálatok irányultak a madár embrionális sejtek hosszútávú megőrzésére, ami a teljes genetikai anyagot tárolja. A génmegőrzés ezen módszere az ősvarsejtek (PGC – *primordial germ cell*) izolálásából, *in vitro* tenyészetek létrehozásából és hatékony mélyhűtésből áll. Ez azonban sokáig nem volt megoldott.



7. ábra: Házityúk embrionális fejlődésének sematikus ábrája (Hamburger & Hamilton, 1992; Wolpert és mtsai., 2019).

Elsőként a PGC-k izolálása vált elérhetővé, mert az embriók tanulmányozása során megfigyelték, hogy madarak esetében a fejlődés során ezek a sejtek a véráramban vándorolnak és megtalálták azt az időablakot, amikor a legnagyobb koncentrációban vannak jelen az embrió vérében. A tojásban lévő embrió a letojás pillanatában blasztoderma és korai gasztrula állapotban van, ami az Eyal-Giladi és Kochav nevezéktan szerinti X-es stádium (7. ábra), ekkor a PGC-k a csírákorong (blasztodiszka) közepén találhatóak (Eyal-Giladi and Kochav 1976), nagyjából 30-100 darab sejt (8. ábra, a). Az idő előrehaladtával az első napon a Hamburger és Hamilton nevezéktan szerinti HH 6-os stádiumban az ősvarsejtek a blasztodiszka közepéből a germinális félholdba vándorolnak (8. ábra, b, c, d) miközben folyamatosan osztódnak, elérik a 300-400 darabos sejtszámot. Az embriófejlődés során, két nap elteltével, HH 12-14-es stádiumban belépnek az embrió vérkeringésébe (Smith and Sinclair 2004; De Melo Bernardo *et al.* 2012; Kagami 2016), majd két és fél napon elérik a vérben a csúcskoncentrációt (HH 14-17), amit vándorlási csúcsnak nevezünk. Ez az az időablak, amikor a leszívott vérből lehetséges PGC vonalakat létrehozni. Ezt követően,

a fejlődés ötödik napján (HH 27) a PGC-k az utóbéli szakasznál kilépnek a vérkeringésből és bevándorolnak a korai ivarszervekbe (8. ábra, e, f).



8. ábra: PG sejtek vándorlása. (a) X. stádiumú (b, c, d) HH 6-os stádiumú (e) HH 14-17-es stádiumú (f) HH 27-es stádiumú embrió (Nieuwkoop & Sutasurya, 1979).

A kutatások már a 2000-es évek elején elkezdődtek, de a PGC-k sejtenyészetekben való fenntartása először csak 2006-ban vált lehetségessé. A PGC vonalak hosszú távon történő fenntartásához kezdetben több embrióból leszívott és kevert vérre volt szükség, mert nem állt rendelkezésre olyan tenyésztőmédiüm, amelyben az egy embrióból kinyert vérben található kis számú PGC túlélne. 2015-ben, egy skóciai kutatócsoport a Roslin Intézetben kifejlesztett egy optimális médiümöt (Whyte *et al.* 2015), amelyben már egyedi embriókból származó sejtek túléltek és osztódtak is. Hazánkban a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ, Haszonállat-génmegőrzési Intézet (NBGK-HGI) és a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet (MATE-GBI) össejtenyésztő laboratóriumában dolgozó kutatóknak sikerült adaptálni ezt a módszert magyar őshonos tyúkfajtákra. A tenyésztőmédiüm olyan faktorokat tartalmaz, amelyek hatására a vér alakos elemei elpusztulnak, míg a PG sejtek túlélnek. A napi médiümcserék során elősegítjük a sejtvonalak tisztulását, ami egy idő elteltével tiszta, vagyis csak ősvarsejteket tartalmazó sejtuszpenziót eredményez. A génmegőrzés pedig ezeknek a sejtenyészeteknek a hatékony mélyhűtésével valósulhat meg. A mélyhűtési technika optimalizálásával hozzájárulhatunk az ősvarsejt alapú génmegőrzés adaptálásához az őshonos fajtáink számára. Baromfi fajok közül a házityúk esetében már sikeres az ivarszervi kimérák és egy fajta esetében a donor

eredetű utódok létrehozása is mélyhűtött – felolvasztott sejtek felhasználásával (Tóth *et al.* 2018, 2019; Lázár, Molnár, *et al.* 2021).

3.4.1. Ósivarsejt tenyészetek karakterizálása

A primordiális csírasejtek a gonád prekursoraihoz vándorolnak, azt kolonizálják, majd az állat későbbi életszakaszában az ivarérés során ezekből a sejtekből alakulnak ki az érett ivarsejtek. A legtöbb állatfajban a PGC-k már az embriogenezis korai szakaszában elkülönülnek a szomatikus sejtektől. Kiemelt jelentőséggel bírnak a fejlődés- és szaporodásbiológiai vizsgálatokban. Mivel a primordiális csírasejtek morfológiai eltéréseket mutatnak a szomatikus sejtektől, szerkezetük fény- és elektronmikroszkóppal is vizsgálható (Nagai *et al.* 2001). Az entoderma és az ektoderma közötti területen, valamint általában a véredény lumenében található PGC-k gyakran gömb alakúak, de pszeudopódiák megjelenése alkalmanként előfordul a szöveti PGC-k és gonadális PGC-k esetében is. Ezek a tulajdonságok arra utalnak, hogy a migráló PGC-k morfológiai változásokon mennek keresztül a lokalizációjuknak megfelelően (Fujimoto *et al.* 1976).

Az őscsírasejtek morfológiai tulajdonságaik alapján is könnyen azonosíthatók; kerek-ovális formájúak, nagy méretűek, nagy sejtmaggal és markáns magmembránnal, tipikus elektronsűrűségű citoplazmatikus struktúrákkal. Átmérőjük fajtól, állapottól és alaktól függően 10-20 μm (Nagai *et al.* 2001). A primordiális csírasejtek általában erősebben festődnek, mint a perifériás szomatikus sejtek, mert a citoplazmájuk magas alkalikus foszfatáz aktivitást mutat, amely indikátor enzimként használható (Deniz Koç and Yüce 2012). Ettől egyértelműbb azonosítási lehetőség a perjódsvav-Schiff-reakción alapuló PAS-festés, mert a glikogén sűrűsége is nagyobb a szomatikus sejtekénél. A PAS festés során a sejtek citoplazmájában sűrű vörös szemcsés testek azonosíthatók. Az ezzel a festési módszerrel vizsgált sejtek eozinofil szemcsékkel rendelkeznek, így pozitív reakciót adnak hematoxilin és eozin festéssel (Nagai *et al.* 2001; Deniz Koç and Yüce 2012).

A PGC citoplazmája specifikus RNS-eket és fehérjéket tartalmaz, mint pl.: a VASA (Hay *et al.* 1988). A VASA egy DEAD box (Asp-Glu-Ala-Asp) család génje (Komiya and Tanigawa 1995), amelyet először a *Drosophila melanogaster*-ben azonosították, mint a csírasejt-képződés anyai meghatározója, ezért a VASA és NANOS gének molekuláris markerként használhatók PGC-k kimutatására (Raz 2000;

Köprunner *et al.* 2001). A VASA homológok gerincesekben is megtalálhatók, VASA génexpressziót azonosítottak házityúkban is (Tsunekawa *et al.* 2000).

Jelenleg azonban a PGC-eket a legkönnyebben monoklonális antitestek alkalmazásával végzett immunhisztokémiai festéssel lehet azonosítani, ilyenek például a stádium-specifikus embrionális antigének, az α -SSEA-1 (Shevinsky *et al.* 1982), α -SSEA-3, SSEA-4 (Shevinski *et al.* 1982), EMA-1 (Hahnel AC and Eddy EM. 1986) és TG-1 (Donovan *et al.* 1987), amelyek mindegyike megköti ezen sejtek felszínén található glikoprotein molekulákat. Ezek közül az α -SSEA-1 a PGC-k legszélesebb körben használt markere.

3.4.2. PGC-k a biotechnológiai kutatás modellrendszerei

Munkánk során csoportunk egyik fő kutatási iránya az embriológiai vizsgálatok mellett, a házityúk hőstresszre adott válaszreakcióinak molekuláris biotechnológiai módszerekkel való feltérképezése. Ezen vizsgálatokat pedig, az embriológiai kutatásokat alkalmazva, sejttenyészeteken is el tudjuk végezni (Anand *et al.* 2016; Tokodyné Szabadi *et al.* 2023), tehát a kísérleti állatok utód generációjáról, ezáltal a genetikai öröklődésről is információt nyerhetünk.

A kutatási eredmények hosszútávú hasznosíthatóságát a gazdasági termelés hatékonyságának fenntartásában szeretnénk kihasználni. Az évtizedek óta tartó, megemelkedett igényeket kiszolgálni próbáló gazdaság működésének a támogatása mellett az ipari mértékű termelés okozta diverzitás csökkenés a sejttenyészetek létrehozásával ellensúlyozhatjuk. A két problémakör megoldása, amely első látszatra ellentmondásosnak tűnhet, együtt is megvalósítható az általunk létrehozott és fenntartott primordiális ősvarsejt-tenyészetek alkalmazásával (Lázár, Molnár, *et al.* 2021).

A kutatásunk két fő mozgató rugója, hogy hogyan lehetne megőrizni a gazdasági termelés hatékonyságát klímaváltozás idejében (Thornton 2010), illetve, hogy a megemelkedett igényeket kielégítő ipari termelés okozta diverzitás csökkenést ellensúlyozzuk (FAO 2007). Ehhez nélkülözhetetlen hatékony génkonzerválási stratégiák kidolgozása, majd azok optimalizálása az eltérő fajokra, fajtákra. Madarak esetében, a laborunk által alapított és tanulmányozott PGC tenyészetek révén kapott információk hozzájárulhatnak mindkét problémakör megoldásához (Lázár, Molnár, *et al.* 2021; Ecker *et al.* 2023).

A génmegőrzés mellett, a PGC tenyészetek új alkalmazási lehetőséggel is szolgálnak az állatbiotechnológiai kutatások terén. Az ősvarsejteken végezhetünk immunfestést, nekrozis és apoptózis mérést (Tokodyné Szabadi N. *et al.* 2021), ezáltal lehetőséget biztosítanak az ősvarsejtek karakterizálására. Emellett izolálhatunk belőlük DNS-t és RNS-t, amikkel további molekuláris biológiai méréseket végezhetünk, meghatározva a fejlődésspecifikus géneket, illetve mikroRNS-ek expressziós mintázatát stb. (Lázár, Molnár, *et al.* 2021). Az állatok hőstresszre adott válaszai mögött meghúzódó molekuláris folyamatokat tárhatjuk fel, génexpressziós vizsgálatok elvégzésével. A PGC tenyészetek ezekben a kísérletekben modellrendszerként alkalmazhatók a szülői generáción végzett kezelések hatására végbemenő molekuláris folyamatok tanulmányozására is (Vinoth *et al.* 2018; Tóth *et al.* 2019).

Úgy gondoljuk, hogy a környezet hatására az ivarsejteken bekövetkező molekuláris változások az utód generációkban is kimutathatók. A hőkezelésnek kitett tyúk utódjaiból létrehozott PG sejt vonalak is hordozzák a kezelés hatására az ivarsejteken létrejött molekuláris változásokat. Ennélfogva a hőkezelt, illetve kontroll PGC vonalaknak mRNS, illetve miRNS expressziós mintázatát összehasonlítva képet kaphatunk arról, milyen védekezési mechanizmusok aktiválódnak a hőkezelés hatására az ivarsejteken (Lázár *et al.* 2018; Vinoth *et al.* 2018).

A miRNS-ek mennyisége erősen szabályozott az embrionális fejlődés során (Darnell *et al.* 2006), kulcsfontosságúak a génszabályozásban, a pluripotencia és az önmegújulási folyamatokban is (Hashemzadeh 2017). Ha a nem kódoló RNS-ek expressziós szintje túl magas lesz, rákot elősegítő ágensként működhetnek, ami miatt a sejtek kikerülhetnek a standard szabályozási mechanizmusok alól, és rosszindulatúvá válhatnak (Picon-Ruiz *et al.* 2016). A miR-302 családba tartozó mikroRNS-ek kulcsszerepet játszanak a sejtnövekedés szabályozásában, például az efrin-A1 által közvetített anti-onkogén jelátvitel új mechanizmusát azonosították rosszindulatú pleurális mezoteliómában (MPM), ahol a miR-302b upregulációja az apoptózis gátlásán keresztül az MM tumorszféra növekedését indukálja (Khodayari *et al.* 2016). A sejt vonalakban történő apoptózis mechanizmusainak és a programozott sejthalál egyéb változatainak tanulmányozása betekintést nyújt a különböző betegségek folyamataiba, és így hozzájárulhat a terápiás stratégiák optimalizálásában.

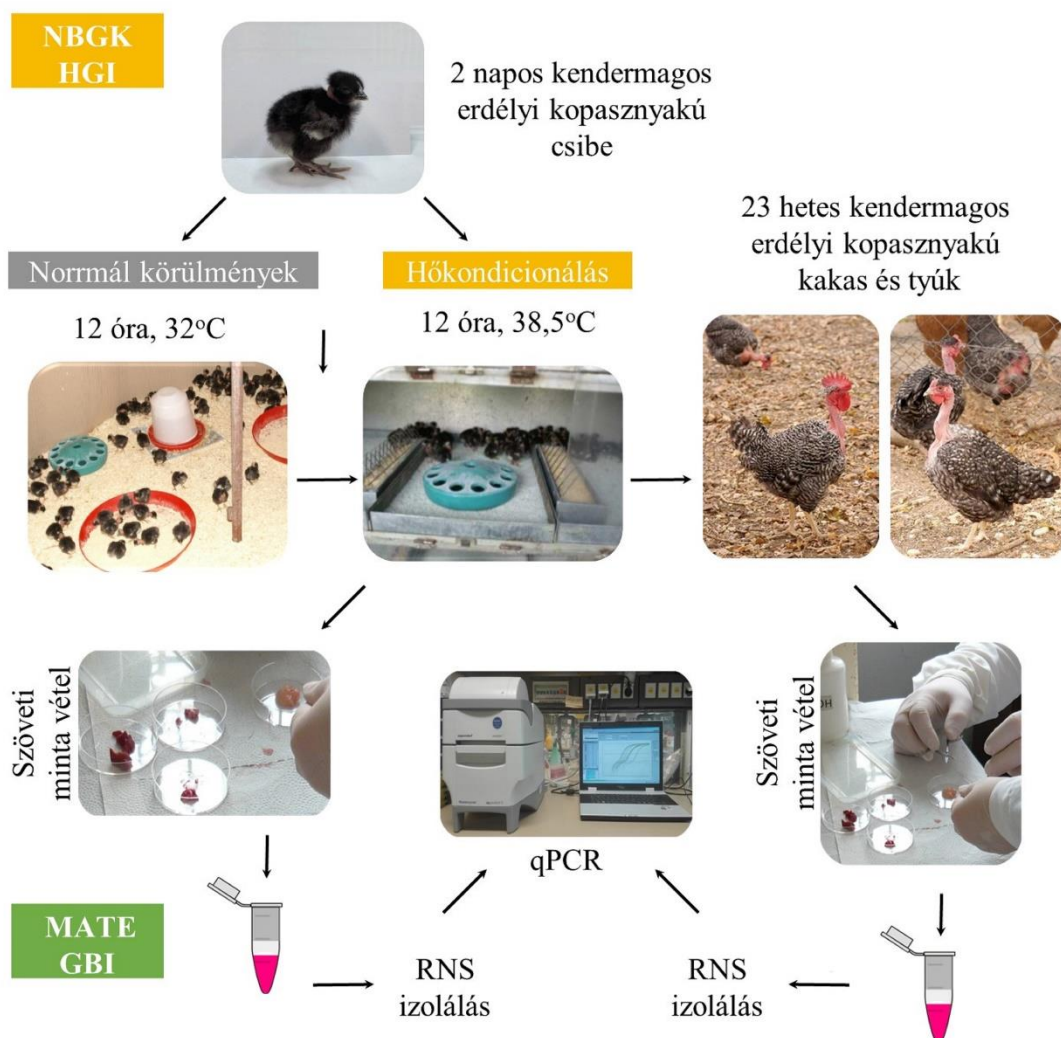
4. Anyag és módszer

4.1. A házityúk kísérleti állomány tartása és hőkezelése

Az állatkísérletek a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ, Haszonállat-génmegőrzési Intézetében (NBGK-HGI) folytak az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvénynek megfelelően, amihez a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi és Állatvédelmi Igazgatósága engedélyt (engedélyszám: PE/EA197-4/2016) adott, valamint innen származtak a megtermékenyített kendermagos erdélyi kopasznyakú és a fekete erdélyi kopasznyakú tyúktojások is. A hőkezelési kísérletek a kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkfajtán történtek, ahol a kísérletet követően megtermékenyített tojások lettek gyűjtve kezelési csoportonként sejtvonal alapításhoz. A PGC vonalak karakterizálásával foglalkoztam a hosszútávú tárolás optimalizálása érdekében, illetve modell rendszerként alkalmaztam a hőkezelés hatásának tanulmányozására. A fekete erdélyi kopasznyakú tyúkkállomány génmegőrzés szempontjából telepi körélmények között volt tartva, így a tőlük gyűjtött megtermékenyített tojásokból alapított PGC vonalak mélyhűtésével újabb módszerrel járultunk hozzá hazai génbank meglétéhez, illetve lehetőség van a tenyészetben lévő sejtek karakterizálására.

A hőkondicionálási kísérlethez a keltetést MIDI F500S keltetőgépben 37,8°C-on, 60%-os páratartalom mellett végezték az NBGK-HGI munkatársai. A kikelés utáni első 24 órában a csibéket (n=60) infravörös lámpa alatt (32°C-on) nedvszívó papíralmon tartották (Tóth *et al.* 2021). A kikelést követő második napon a csibék felét (n=30) visszahelyezték a keltetőgépbe hőkondicionálás céljából. A hőmérsékletet 38,5°C-ra, a páratartalmat pedig 60%-ra állították be 12 órán keresztül. A kezelést követően a csirkéken nyaki diszlokációt végeztek, majd közösen megkezdtük a szöveti mintagyűjtést a kontroll (K-C, n=15) és a hőkondicionált csibék (HK-C, n=15) feléből. A kontroll és a kezelt csoportban az állatok másik felét (K-F, n=15 és HK-F, n=15) ivarérett korig (23 hetes korig) csoportonként egy légtérben, faforgács és zeolit keverék almon, 16 órás világítás mellett nevelték tovább. Az ivóvíz és a takarmány a teljes kísérlet során *ad libitum* elérhető volt az állatok számára. A mintavételhez a felnőtt egyedeken nyaki diszlokációt alkalmaztak (K-F, n=9 és HK-F, n=12), ezt követően pedig először a koponyát, az öreglyuk felől nyitottuk fel sebészeti csontcsípővel. A kisagyat és a nagyagyat sebészeti ollóval óvatosan eltávolítottuk, majd a gerincvelő felől az agytörzs és köztiagyi részt kivágtuk és RNAlater™ oldatot

(Thermo Fisher Scientific, 145 Waltham, MA, USA) tartalmazó steril fagyasztó csövekbe (9. ábra) (Tokodyné Szabadi *et al.* 2024) helyeztük. A mintákat két nap elteltével TRIzol®-ba (#15596026, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) helyeztem át, majd -70°C -on tároltuk RNS izolálásig.

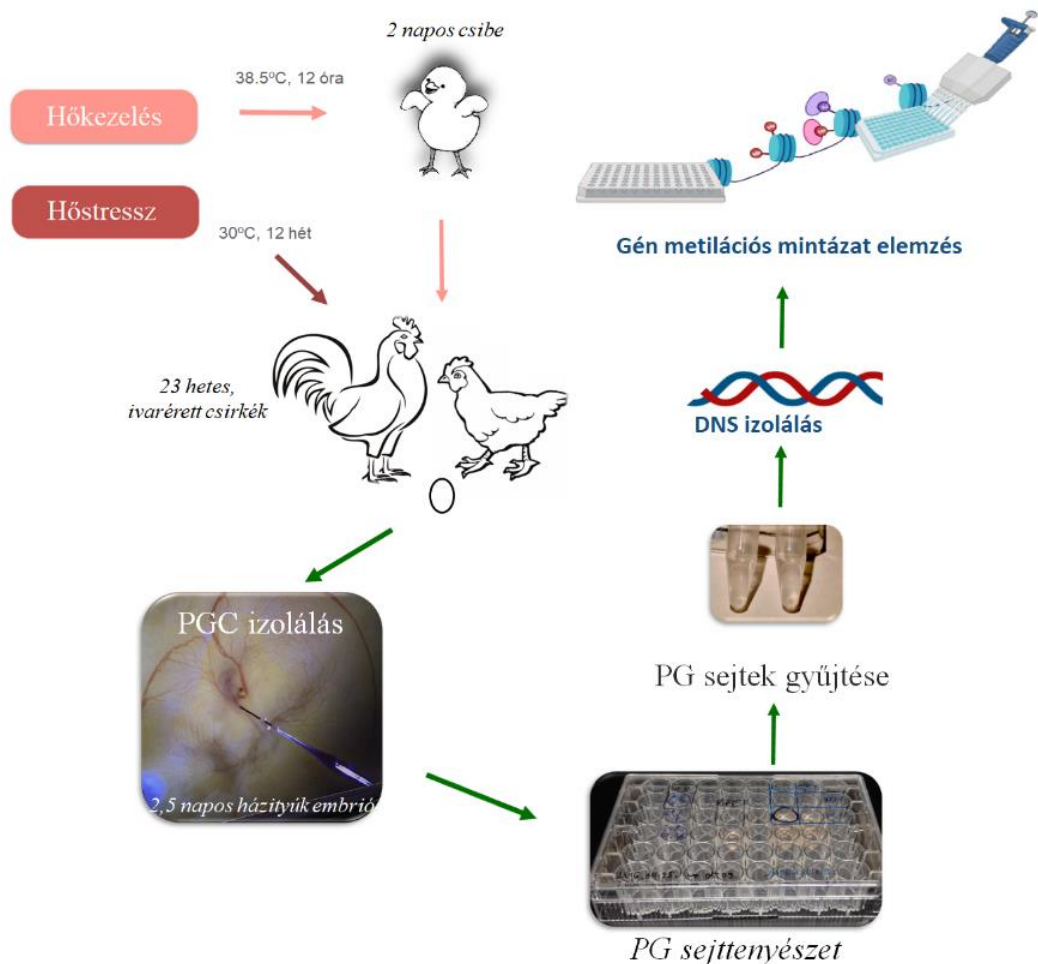


9. ábra: Hőkezelési kísérlet folyamatábrája.

A hőstressz következtében aktiválódó molekuláris útvonalak tanulmányozásához tartozó állatkísérleteket is az NBGK-HGI munkatársaival közösen végeztem. A tojásokat MIDI F500S keltetőgépben $37,8^{\circ}\text{C}$ -on, 60%-os páratartalom mellett inkubálták. A kikelés utáni első 24 órában a csibéket infravörös lámpa alá helyezték 32°C -on nedvszívó papíralmon, a takarmány és a víz *ad libitum* hozzáférhető volt (Tóth *et al.* 2021). Ezután a 2 napos fiókák harmadát visszahelyezték a keltetőgépbe hőkezelésre. A hőmérsékletet $38,5^{\circ}\text{C}$ -ra, a páratartalmat pedig 60%-ra állították be 12 órán keresztül. Az ivóvíz és a takarmány *ad libitum* volt bent. A többi

csibét mélyalmon, *ad libitum* takarmányozás mellett, 32°C-on tartották. Ezután a hőkondicionált és kezelést nem kapott állatokat azonos körülmények között nevelték. Ivarérést követően (23 hetesen) a hőkondicionált csoport (*heat treatment and heat stressed* – HTHS) és a kezelést nem kapott állatok felét (*heat stressed* - HS) hőstresszelték, 30°C-on való tartással 12 hétig, egy légtérben, faforgács és zeolit keverék almon, 16 órás világítás mellett, a takarmány és víz *ad libitum* elérhető volt. Azok az állatok, amelyek nem kaptak sem hő-kondicionálást sem hőstresszt, azokat tekintették kontroll (K) csoportnak.

Az utód generáció vizsgálatához a megtermékenyített tojásokat a kezelések szerint három csoportba sorolt háziyúkoktól gyűjtötték. Eszerint volt a kontroll (K) csoport, a 2 naposan hőkondicionált és 23 hetesen hőstresszelt csoport (HTHS) valamint a 23 hetes korban hőstresszelt csoport (HS) (10. ábra).



10. ábra: Hőkondicionálási kísérlet folyamatábrája (Anand *et al.* 2016; Dunislawska *et al.* 2021).

4.2. PG sejtek gyűjtése, tenyésztése

A kendermagos és fekete erdélyi kopasznyakú tyúkok utód generációinak embrióiból alapított sejtenyészeteket Lázár Bence kollégám alapította, majd a sikeresen felszaporított vonalakat génbankban helyezte el. Ezen munka során a megtermékenyített tojásokat keltetőgépbe helyezte (37,8°C, 60%-os páratartalom), majd 2,5 nap elteltével izolált PG sejteket a Hamburger-Hamilton féle nevezékten szerinti HH14-16-os stádiumú embriók véréből (Hamburger and Hamilton 1992). Az izolálás az embrió dorzális aortáján keresztül történt egy üveg mikropillárisal, amivel egyedenként 1-2 µl vért tudott összegyűjteni. Ezt a mennyiségű vért egy speciális tenyésztőmédiumba helyezte, ami csak a PG sejtek fejlődését támogatja, egy pár héten belül a vérsejtek elpusztulnak, majd egy tiszta PGC tenyészet hozható létre (11. ábra, A).

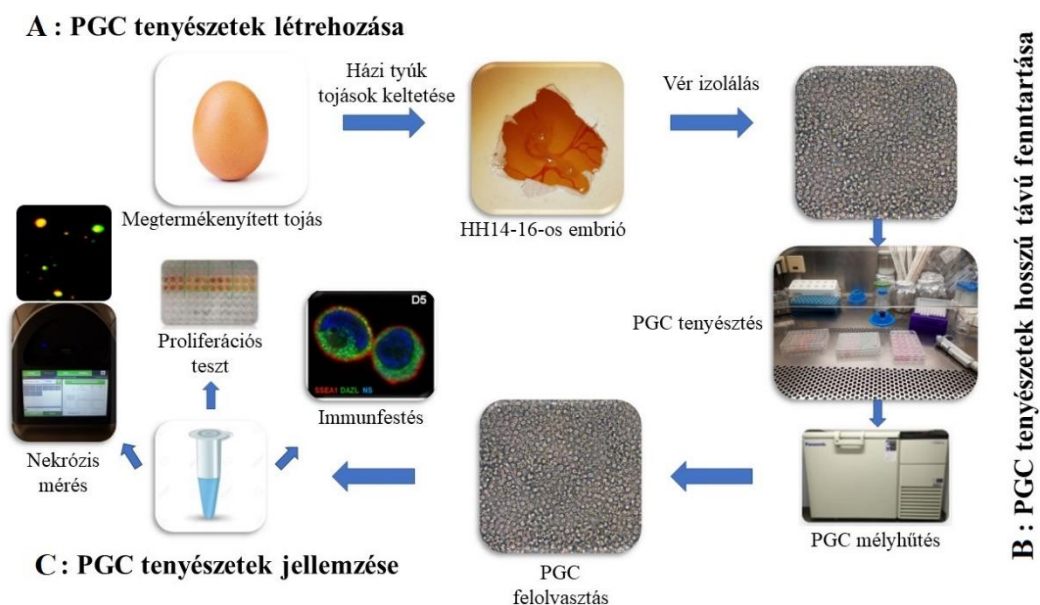
A felhasznált médium elkészítésének leírása a skóciai Roslin Intézettől származik (Whyte *et al.* 2015; Lázár, Molnár, *et al.* 2021). A sejtvonalak tenyésztése során az elsődleges cél a génbank létrehozása, vagyis a megfelelő mennyiségű és minőségű sejtszám elérését követően az egyes vonalak mélyhűtése és hosszú idejű tárolása -150°C-on, illetve folyékony nitrogénben (Silva *et al.* 2023). A sejtek egy részét a laborunk által kifejlesztett mélyhűtési protokoll alapján mélyhűtöttük a hosszú távú fenntartás érdekében (Lázár, Molnár, *et al.* 2021). A kiindulás a hőkezelési kísérletben részt vett kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkok tojásai voltak (47 db), amelyekből 26 primordiális ivarsejtvonalat sikerült létrehozni (2. táblázat) (11. ábra, B).

2. táblázat: PG sejtvonalak alapításának sikeressége számokban kifejezve

	Kontrol csoport (K)		Hőstresszelt csoport (HS)		Hőkondicionált és hőstresszelt csoport (HTHS)	
	DB	%	DB	%	DB	%
Tojások száma	47	100	47	100	47	100
Fennmaradt PGC-vonalak száma	8	17,02	7	14,89	11	23,4

Lehetőségem volt ezeknek a mélyhűtött sejtenyészeteknek a felolvasztására, majd továbbtenyésztésére és azok vizsgálatára (11. ábra, C). Minden sejtvonalt

esetében az újratenyésztést követően ismét mélyhűtöttem a sejteket, illetve pelletet gyűjtöttem DNS izoláláshoz, amelyeket -70°C -on tárolhattam a feldolgozásig. További vizsgálatokhoz (RNS izoláláshoz) a sejteket az *RNAqueous™ Total RNA Isolation Kit (Invitrogen™ AM1931, Fisher Scientific part of Thermo Fisher Scientific)* lízis pufferében gyűjtöttem össze, majd -70°C -on tároltam az RNS izolálásig.



11. ábra: PGC vonalak karakterizálásának folyamatábrája (Tóth *et al.* 2018, 2019; Lázár, Molnár, *et al.* 2021).

4.3. PG sejtek karakterizálása

4.3.1. Nekrózis mérése

A nekrózis mérését apoptotikus/nekrotikus/egészséges sejt-detektáló, *PromoKine Kittel (PK-CA707-30018)*, *Arthur™ (Arthur Novel Fluorescence Cell Counter, NanoEnTek, Pleasanton, CA, USA)* fluoreszcens sejtszámlálóval végeztem. A mérések megkezdése előtt a készüléken beállítottam a megszámolni kívánt sejtek méretének (10-30 μm), illetve a zöld és piros hullámhosszok intenzitásának határértékeit (*Green channel LED*: nagyobb, mint 2500 nm, *Red channel LED*: nagyobb, mint 3000 nm). Elsőként meghatároztam az adott tenyészetekben (kendermagos vagy fekete erdélyi kopasznyakú tyúkfajta) a sejtszámot. Ez alapján számoltam ki a méréshez szükséges oldatok mennyiségét. A tenyésztő médiumban lévő sejteket vizsgálati csoportonként, illetve vonalanként pooloztam. A sejteket 1200

rpm sebességgel, 5 percig centrifugáltam. A letapadt sejtekről leszívtam a használt médiumot, majd 1 ml DPBS (14190-144, Gibco) oldatban szuszpendáltam. Ezekből a sejtszuspenziókból mértem 25-25 μ l-t a sejtszámláló lemez (*ArthurTM slide, NanoEnTek*) A és B oldalára. Elsőként a nem festett sejtek esetében határoztam meg a fluoreszcencia határértékeket az A oldalon (*background* felvétele) majd a B oldalon is meghatároztam a sejtszámot. A sejtszám a két mérés átlagából adódott.

A mérésekhez a sejteket fluoreszcensen jelölt ellenanyagokkal festettem meg. A fluoreszcens festékek intenzitásának ellenőrzéseként elsőként öt párhuzamos mintát készítettem vonalanként. Az első csoportban lévő sejteket nem festettem. A második csoporthoz *Annexin*t használtam, ahol a korai apoptózisban lévő sejtek festődnek. A harmadik csoportnál *Ethidium-homodimert* alkalmaztam, ami a nekrosis fázisába lépő sejteket festi, a negyediket *Hoechst 33342*-vel kezeltem, ami az élő sejtek sejtmembránján is képes áthatolni, s megfesteni a sejtmagokat. Az ötödikben mindhárom festéket alkalmaztam. Mindehhez szükség volt egyszeres töménységű pufferre (*Binding buffer*, ami a kit része, egy izotóniás puffer, amely kalciumot tartalmaz, ez elengedhetetlen az Annexin V foszfatidil-szerinhez való kötődéséhez), amit sejtszám függvényében (5×10^5 db/ml) az ötszörös töménységű pufferből hígítottam. A sejtek szuszpendálásához 100 μ l, a festés leállításához 400 μ l puffer kellett, 20%-os ráhagyással számítva 120 μ l ötszörös töménységű pufferhez 480 μ l vizet (W1503, Sigma) mértem.

A 950 μ l sejtszuspenziót 5 db 1,5 ml-es Eppendorf csőbe arányosan szétosztottam (190-190 μ l/cső), 1200 rpm fordulaton 5 percig centrifugáltam, a DPBS-t leszívtam, majd 20-20 μ l pufferben szuszpendáltam a sejteket. Ezután a festékekből 1-1 μ l-t adtam hozzá. 15 perc inkubációt követően (25°C, sötétben), 80-80 μ l pufferrel inaktiváltam a festékeket. A mérésekhez 25-25 μ l-t használtam csoportonként.

4.3.2. Proliferációs teszt *CLARIOstarR Microplate Reader*rel

A kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk fajta egy női ivarú (B2 elnevezésű), alacsony proliferációjú, illetve egy hímivarú (D5 elnevezésű) magas proliferációjú sejtvonalain proliferációs tesztet végeztem a nekrosis mérések alátámasztásához. Először mindkét vonal sejtjeit centrifugálással tisztítottam, majd friss tenyésztőmédiumban szuszpendáltam és az *ArthurTM* sejtszámlálóval (*Arthur Novel Fluorescence Cell Counter, NanoEnTek, Pleasanton, CA, USA*) meghatároztam a sejtszámokat, aminek függvényében 5000 db/100 μ l töménységű, 1 ml szuszpenziót

hígítottam és mindkét sejtvonalból 9-9 lyukba osztottam szét a sejteket 96 lyukú lemezen.

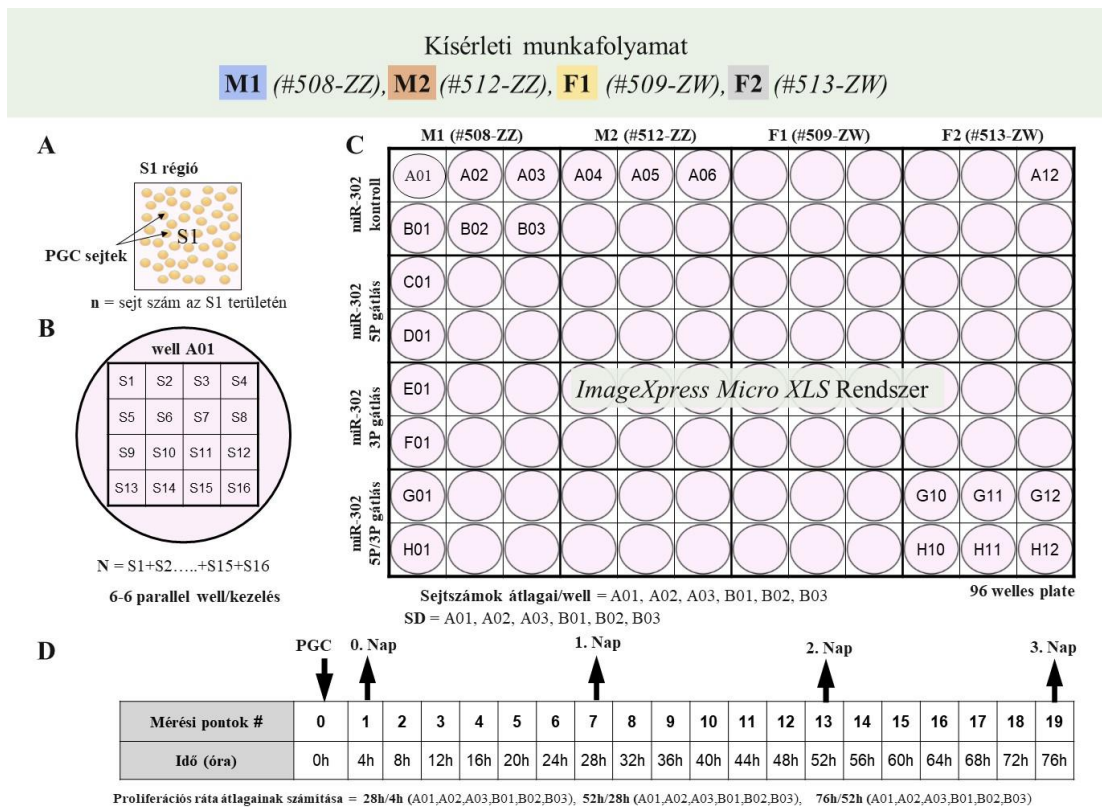
A következő napon mindkét vonalból az első három lyukhoz 10-10 μ l CCK8-t adtam (*Cell Counting Kit-8* (CK04, Dojindo)) és három óra elteltével végeztem el a *Mikroplate ELISA* leolvasó készüléken a méréseket (optikai sűrűség abszorbanciájaként 450 nm-en mértük a *CLARIOstarR Mikroplate Reader* (BMG, Labtech, USA) alkalmazásával). Ezt a mérést a következő két napon is megismételtem.

4.3.3. Proliferációs teszt *ImageXpress Micro XLS*-sel

A házityúk PGC vonalak sejtszámlálását a sejtproliferációs vizsgálat elkészítése előtt végeztem *ArthurTM Novel Fluorescence Cell Counter* (*NanoEnTek, Pleasanton, CA, USA*) készülék segítségével. A mérés során négy fekete erdélyi kopasznyakú tyúk eredetű vonallal (két hímivarú M1: #508-ZZ; M2: #512-ZZ és két női ivarú F1: #509-ZW; F2: #513-ZW) dolgoztam, ahol háromféle kezelést (**K** - kontroll; **5P** - gga-miR-302b-5P gátlás; **3P** - gga-miR-302b-3P gátlás; **5P/3P** - gga-miR-302b-5P és gga-miR-302b-3P gátlás) és egy kontrollt alkalmaztam és minden esetet 6-6 párhuzamos lyukon vizsgáltam (Lázár, Szabadi, *et al.* 2021).

Minden egyes vonalból 24 lyukú lemezről 6-6 lyukból gyűjtöttem össze a sejtszuspenziókat, amelyekből 25-25 μ l-t mértem az Arthur készülék lemezeire, vonalanként két párhuzamos számlálással állapítottam meg a sejtszámokat. A sejtszámokat ismerve osztottam szét a sejtszuspenziókat a 96 lyukú lemezre úgy, hogy minden egyes lyukba 10^3 -on sejt legyen, az elrendezés vonalanként három oszlopban, kezelésként két-két sorban (12. ábra, C).

A lemezt egy beépített inkubátorral rendelkező *ImageXpress Micro XLS* készülékbe helyeztem és annak *High-Content Screening* képalkotó rendszere végezte a mérést lyukanként (A01-H12), minden lyuk 16 (S1-16) régiójában (12. ábra, A és B), 4 óránként 3 napon keresztül készített felvételekkel végeztem az adatok kiértékelését. Például a harmadik napon a proliferációs rátát úgy számítottam ki, hogy a harmadik napon megszámolt átlagos sejtszámot (h76) elosztottam a második napon (h52) mért értékkel. Összehasonlítottam a kontroll és a kezelt vonalak proliferációs rátáját az első napon (28 óra/4 óra), a második napon (52 óra/28 óra) és a harmadik napon (76 óra/52 óra) (12. ábra, D).



12. ábra: *ImageXpress Micro XLS* műszeres mérés összeállításának sematikus ábrája.

A 3. napon a proliferációs tesztet követően apoptózis arányt is mértem *10x Annexin V Binding Bufferrel (AD10—Dojindo Molecular Technologies, Inc., Rockville, MD, USA)*, amit szövettenyésztéshez megfelelő minőségű vízzel (*Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA*) 1x-re hígítottam. Mind az *Annexin V*, mind a *Propidium-jodid* komponenseket 5 µl/teszt mennyiségben alkalmaztam, 100 µl végtérfigatban. A PGC-k apoptotikus és nekrotikus arányát szintén az *Arthur Novel Fluorescence Cell Counter (NanoEnTek, Pleasanton, CA, USA)* segítségével mértem.

4.3.4. Immunfestés

A nekrozis mérés során a háromféle festékkel (*Annexin, Ethidium-homodimer, Hoechst 33342*) kezelt sejtszuszpenziókból a sejtszámolások után visszamaradt szuszpenziókat (50 µl) 1200 rpm fordulatszámom 5 percig centrifugáltam, minden Eppendorf csőben 10-10 µl DPBS-ben szuszpendáltam a sejteket, amit tárgylemezre cseppentettem. A tárgylemezt 30°C-os előmelegített felületre helyezve beszárítottam. Minden mintát 50 µl 4%-os PFA-val fixáltam (inkubálás szobahőmérsékleten 10 percig, sötétben). A fixálás után a PFA-t leszívtam és két egymást követő lépésben DPBS-sel mostam őket (inkubálás RT, 10 perc, sötét). A mosófolyadékot leszívtam és

fedőmédiával (*Vectashield, H1000, Vector Laboratories*) és fedőlemezzel lefedtem. A felvételeket Leica fluoreszcens sztereomikroszkóppal (M205FCA) készítettem.

A kendermagos és fekete erdélyi kopasznyakú tyúk eredetű sejtvonalakon elsődleges és másodlagos ellenanyaggal is elvégeztem az immunfestést. A PGC tenyészeteket tisztítottam (centrifugálás: 1200 rpm, 5 perc) (szuszpendálás: 0,1%-os BSA-PBS, RT, 15 perc), *ArthurTM* sejt számlálóval (*Arthur Novel Fluorescence Cell Counter, NanoEnTek, Pleasanton, CA, USA*) ellenőriztem a sejtszámokat, vonalanként külön tárgylemezre cseppenttem a sejteket, majd 4%-os PFA-val fixáltam (20 µl/csepp, RT, 10 perc). A fixálóoldat kimosása 0,01%-os BSA-PBS-el három ismétlésben (RT, 5 perc) történt. Ezt követően az elsődleges ellenanyagokat (SSEA-1, CVH, DAZL, P63) különböző kombinációban (28. ábra) alkalmazva mértem rá egy-egy kicseppentett sejtpopulációra, amit egy éjszakán át 4°C-on, sötétben inkubáltam. A következő napon 0,01%-os BSA-PBS-el lemostam az elsődleges ellenanyagokat, majd rámértem a másodlagos ellenanyagokat (anti-egér(m)-IgM-D549(r), anti-nyúl(rab)-IgG-A488) (minden esetben hagytam egy-egy negatív kontrollt), amit egy órán át 37°C-on, sötétben inkubáltam. Egy órával az első mosást követően (0,01% BSA-PBS, RT, 5 perc) mindkét vonal minden cseppjére To-Pro-3 sejt magfestéket vittem fel, amit 15 perc után kimostam három ismétlésben (0,01% BSA-PBS, RT, 5 perc). A lemezeket lefedtem és sötétben tároltam a Leica konfokális (TCS SP8) mikroszkóppal történő fotózásig.

4.4. RNS izolálás és cDNS írás

Az RNS izolálása a hőkondicionálási kísérletben a kontroll és hőkezelt csibék, illetve a kontroll és hőkezelt ivarérett kakasok és tyúkok agyszövetéből történt. A *TRIzol*®-ba (#15596026, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*) legyűjtött mintákat felolvasztottam, majd homogenizáltam. Az izolálást a *TRIzol*® gyártói protokolljának megfelelően végeztem el. A folyamat eredményeként kapott RNS-ek koncentrációját *NanoDrop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, UV-Vis)* spektrofotométerrel ellenőriztem.

A PGC vonalak karakterizálásához, illetve a hőstressz hatásának tanulmányozásához az RNS izolálása a három kezelési csoportból HTHS, HS és C származó kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkok 2,5 napos tojásaiban fejlődő, HH14-16-os fejlettségi állapotú embriókból létrehozott PGC tenyészetek sejteiből történt. A lízis pufferben gyűjtött PGC mintákat tartalmazó fagyasztó csöveket 90

másodpercre 37°C-os vízfürdőbe téve felolvastottam, majd a PG-sejtekből *RNAqueous™ Total RNA Isolation Kittel*, a protokoll alapján elvégeztem az RNS izolálást. Az izolálás során kapott RNS koncentrációját szintén *NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific, UV-Vis)* spektrofotométerrel mértem.

A qPCR vizsgálatokhoz az RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltam. A reakcióhoz az RNS mennyiségét a spektrofotométerrel mért értékek alapján 25 ng/μl koncentrációra hígítottam. A cDNS íráshoz *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et (Life Technologies, Carlsbad, CA)* használtam.

4.5. RNS szekvenálás

Az RNS szekvenálást Bertrand Pain (*Stem-Cell and Brain Research Institute, USC1361 INRA, U1208 INSERM, 69675 Bron, France*) és kutatócsoportja végezte a kezelési csoportonként összeállított RNS pool mintáinkból (C, HS, HTHS) (13. ábra).

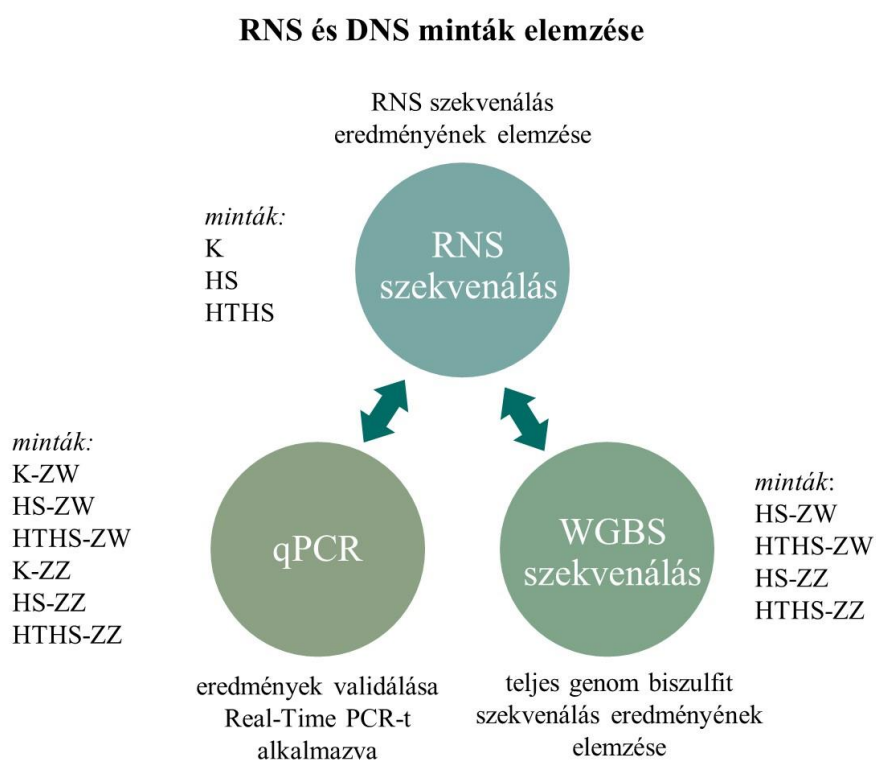
A szekvenálási eljárások csak a DNS nukleinsavsorrendjének meghatározására alkalmasak, a kis RNS-eket először DNS-sé kellett átírni. Ehhez az RNS mintákat méret szerinti frakciókra szedték, majd ismert szekvenciájú adapterek kapcsolása után végezték a cDNS írást. Az RNS könyvtárak elkészítéséhez Illumina „*TruSeq Small RNA Library Prep*” kitet használtak.

Az elkészített könyvtárak szekvenálását *Illumina MiSeq (E11G1 és E14G1)* vagy *Illumina Solexa Platform (Illumina, San Diego, CA, USA, BC1, BC2, E7PGC1, E7PGC2, E11G2, E14G2)* esetén segítségével végezték el, 50 és 75 bp olvasási hossz beállítással.

A bioinformatikai elemzéseket szekvenciaelemző programcsomagokkal (*Genomics Workbench* és a *Geneious*) hajtották végre. Az elemzés során először eltávolították a kis RNS-ekhez kapcsolt ismert szekvenciákat, ezután az RNS szekvenciákból átfedő szakaszokat kerestek és kontigokká szerkesztették össze. A kontigokat meglévő referencia genomra illesztették. A bioinformatikai elemzések eredményeinek megerősítése érdekében molekuláris biológiai módszereket (pl. RT-PCR) alkalmaztunk.

4.6. Real-time PCR

A hőkezelés hatására indukálódó markerek expressziós mintázat változásának nyomon követését real-time PCR (qPCR) technika segítségével végeztem. A qPCR-hoz 96 lyukú lemezt használtam, a reakciót *Mastercycler Realplex⁴ epGradient S* (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany) készülékben végeztem (Tóth *et al.* 2021). Az mRNA expressziók vizsgálatához az előzőleg elkészített cDNS oldatokból 0,75µl-t, a SYBR Green festéket és a primereket tartalmazó qPCR mixből 14,25µl-t mértem be lyukanként. Minden minta/primer esetében 3 párhuzamos mérést végeztem. Míg a miRNA-ek esetében speciális *TaqMan* próbákat alkalmaztam, ahol szintén a cDNS oldatokat használtam, amelyekből 1µl-t, a *TaqMan* master mixet és a primereket tartalmazó qPCR mixből 14µl-t mértem össze. Minden minta/primer esetében 3 párhuzamos mérést végeztem. Belső kontrollként (háztartási génként) *GAPDH*-t alkalmaztam, illetve a vizsgálandó markerek esetében a szakirodalomban is leírt primer párokat (*HSP70*, *HSP90*, *HSF1*, *HSF2*, *HSF3*, *HSF4*, miR-92-3P, miR-138-5P) használtam (Kisliouk *et al.* 2011; Xie *et al.* 2014).



13. ábra: RNS és DNS minták elemzése (Dunislawska *et al.* 2021; Prastowo and Ratriyanto 2021).

4.7. DNS izolálás

A DNS izolálása a három kezelési csoportból HTHS, HS és K származó tyúkok 2,5 napos tojásaiban fejlődő, HH14-16-os fejlettségi állapotú embriókból létrehozott PGC tenyészetek sejtjeiből történt. A sejtenyésztést követően, mikor egy-egy tenyészet elérte a 10^5 -en sejtszámot, a sejteket összegyűjtöttem, centrifugáltam, eltávolítottam a médiumot, PBS (fiziológiás sóoldat) oldattal szuszpendáltam, végül újra centrifugáltam a sejteket, az oldatot leszívtam. Az Eppendorf csőben lévő sejt pelletből végeztem a DNS izolálást, amit a *DNA Isolation Kit for Cells and Tissues* (Roche® Life Science Products) kittel végeztem a hozzá tartozó protokoll alapján. Az izolálás során kapott DNS minták koncentrációját *NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific, UV-Vis)* spektrofotométerrel mértem.

4.8. Teljes genom biszulfid szekvenálás és metilációs mintázat elemzés

A sejt vonalokból kapott DNS minták metilációs mintázatának feltérképezése céljából végzett teljes genom biszulfid szekvenálást az *UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft.* (Debrecen) szolgáltatta. A teljes genom biszulfid szekvenálás a nem-metilált citozin bázisok timinné konvertálásán alapul. A kapott DNS metilációs adatok elemzését Dr. Likó István (*UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft.*) végezte a kezelési csoportonként (HS, HTHS) összeállított ivari (ZW – női, ZZ – hímivarú) pool DNS mintákból (HS-ZW, HTHS-ZW, HS-ZZ, HTHS-ZZ) (13. ábra).

Az *UD-Genomed Illumina HiScanSQ NGS platformot* használ a szekvenálási projektekben. A *HiScanSQ* rendszer integrálja az új generációs szekvenálás teljesítményét és felbontását a genotipizálás, génexpresszió és metilációs *array*-ek nagy áteresztőképességével. A műszer két különálló komponensből áll, a *HiScan Reader*-ből és az *SQ Modul*-ból. A *HiScan Reader* nagy sebességű, precíziós képalkotó szkennerként működik az *Illumina* szekvenáláshoz és *microarray*-alapú elemzésekhez. Az *SQ Module* egy reagenskezelő *fluidum*-eszköz, amely az *Illumina* új generációs szekvenálásának végrehajtásához szükséges.

Az *Illumina* szekvenálási munkafolyamat három egyszerű lépésen alapul: a nukleinsav mintákból könyvtárakat készítenek, ezeket amplifikálják klonális klaszterek előállítására, majd párhuzamos szintézissel szekvenálják. A könyvtár előkészítése elvégezhető az *Illumina* egyszerűsített *TruSeq sample prep* kittel vagy a

Nextera's Illumina sequencer-compatible DNA Sample Prep Kittel. A klaszter generálás a *cBot* automatizált klaszter generáló rendszeren történik, ami kevesebb, mint tíz perc, szemben a hat órát is igénylő emulziós PCR-módszerekkel.

Az *Illumina Bead Array* termékei hatékony *array* alapú megoldást biztosítanak genotipizáláshoz, génexpressziós profilalkotáshoz és metilációs elemzésekhez. A *DASL®* és a *DirectHyb Assays* rendkívül pontos genomszintű expressziós profilt tesz lehetővé számos mintatípusból.

4.9. Statisztikai analízis

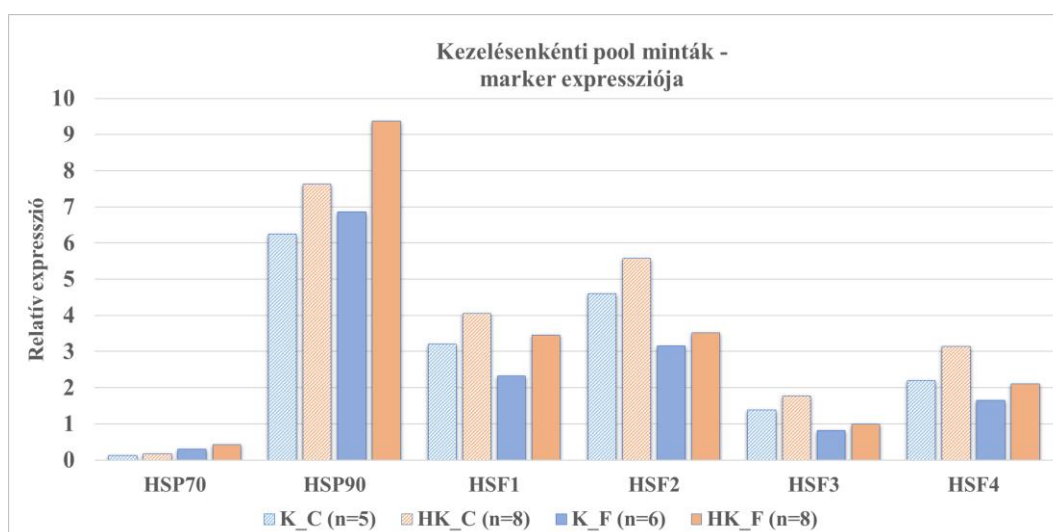
A célgén expresszióját, vagy represszióját a belső kontrollgénhez viszonyítva minden mintában *GenEx 7.0* program (*MultiD Company*) segítségével számítottam ki a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszer használatával (Rao és mtsai., 2013). Belső kontrollnak a konstitutívan expresszáldó *GAPDH* (NM204305.1) gén expresszióját mértem az 5'-AGCAATGCTTCCTGCACTAC-3' / 5'-CTGTCTTCTGTGTGGCTGTG-3' primer-pár alkalmazásával. A *Ct* küszöbértéket (*threshold cycle*) manuálisan határoztam meg. Minden cDNS reakció ΔCt értékeit a $(Ct_{\text{célgén}} - Ct_{\text{belső kontroll}})$ képlet alapján normalizáltam, majd a ΔCt értékek átlagait (átl. $\Delta Ct_{\text{gén}}$) határoztam meg. A $\Delta\Delta Ct$ értékek meghatározása során a kezelt minták (átl. $\Delta Ct_{\text{gén-kezelt}}$) értékeit a kezeletlen kontrollhoz (átl. $\Delta Ct_{\text{gén-kezeletlen}}$) normalizáltam (átl. $\Delta Ct_{\text{gén-kezelt}} - \text{átl. } \Delta Ct_{\text{gén-kezeletlen}}$).

Az adatok kiértékelését *GenEx 7.0* szoftver segítségével végeztem. ANOVA analízist követően Tukey-féle post hoc eljárást alkalmazva azonosítottam, hogy mely csoportok átlagai közötti eltérés szignifikáns, ahol a $p < 0,05$ értékeket vettem szignifikánsnak (* $p < 0,05$).

5. Eredmények és azok megbeszélése

5.1. Szülői generáció molekuláris biológiai vizsgálata

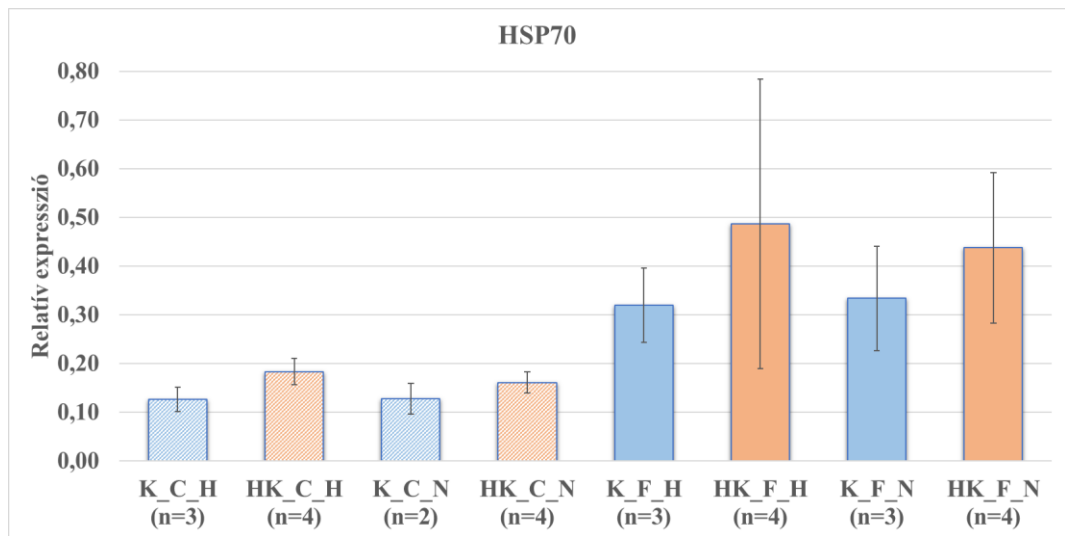
A qPCR vizsgálatokat kezeléenkénti (K-kontroll; HK-hőkoncionált) pool mintákkal (14. ábra), illetve egyedi házityúk agyszövetmintákkal végeztem, amelyeket kezeléenként (K; HK) és ivar szerint (H-hímivarú; N-nőivarú) ábrázoltam csibe (C), illetve ivarérett/felnőtt (F) korban (15, 16, 17, 18, 19, 20. ábra). Minden marker expressziója (*HSP70*, *HSP90*, *HSF1*, *HSF2*, *HSF3* és *HSF4*) esetében emelkedést tapasztaltam a kezelt csoportokban (HK-C; HK-F) a kontrollhoz képest. A *HSF1* expressziójának emelkedése az ivarérett hímek agyszövetében szignifikáns volt ($p=0,0478$) (17. ábra) a hőkoncionálás hatására (Tokodyné Szabadi *et al.* 2024).



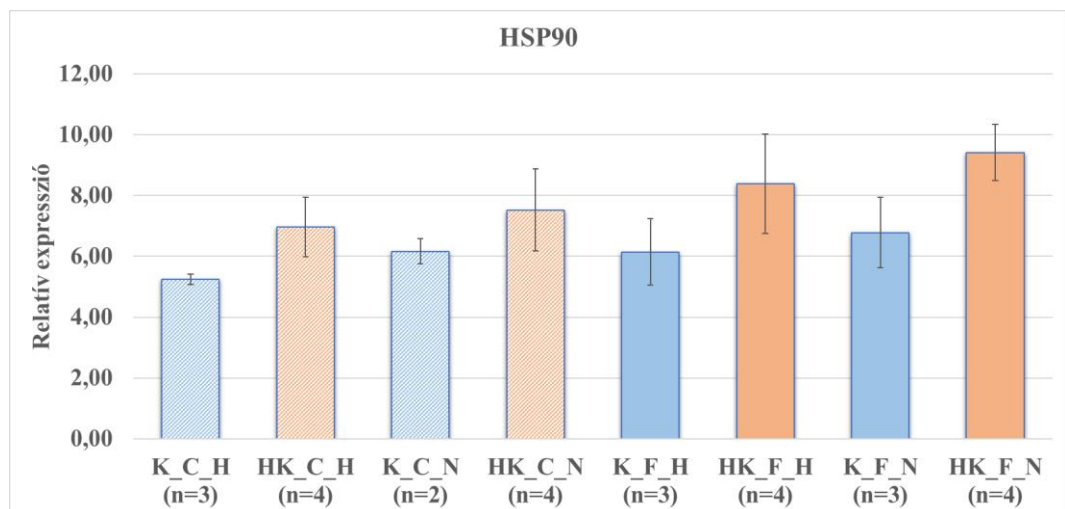
14. ábra: Kezeléenként poolozott (K-kontroll; HK-hőkoncionált) csibe (C) és ivarérett/felnőtt (F) házityúkok agyszövetmintáiban mért hősokkfehérjék és hősokkfaktorok génexpressziós szintjei.

Megállapítottam, hogy a hősokkfehérjék (*HSP70*, *HSP90*) és hősokkfaktorok (*HSF1*, *HSF2*, *HSF3* és *HSF4*) expressziója kimutatható a kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkok és kakasok agyszövet mintáiban. Az általunk alkalmazott hőkoncionálás okozta a génexpressziós szintemelkedést minden hősokkfehérje és hősokkfaktor esetében fiatal és felnőtt korban egyaránt. A *HSF1* expressziójának fokozódásához a hőmérséklet különbség járul hozzá, amihez egy bizonyos termikus küszöbértékre van szükség, azonban ennek pontos értéke még nem tisztázott (Tanabe *et al.* 1997). Mivel akut hőkezelés esetén a HSF-ek kifejeződésének gyors emelkedése figyelhető meg, úgy gondolják, hogy a HSF-ek nélkülözhetetlenek lehetnek a HSP-k

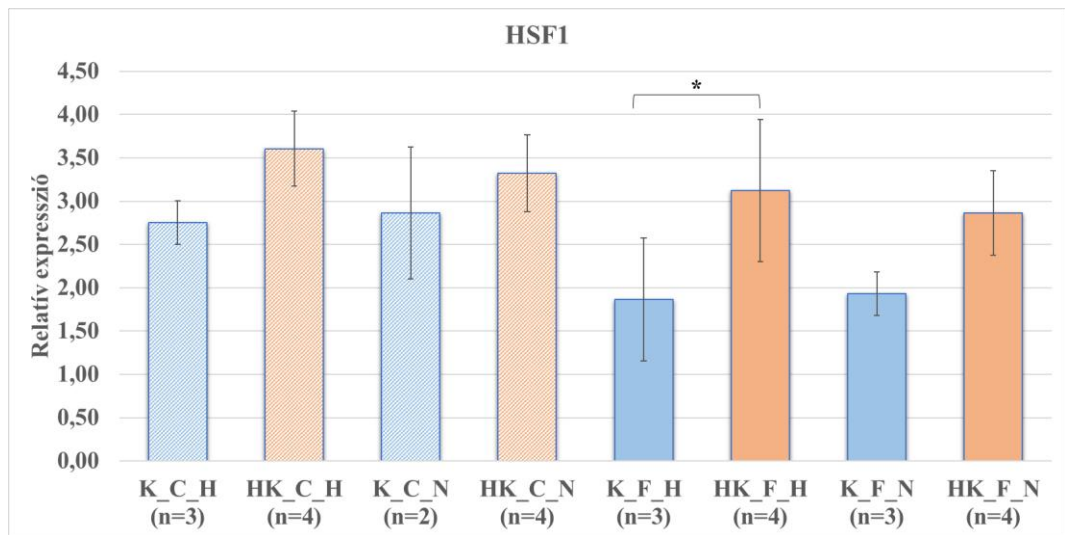
gyors transzkripciójához (Xie *et al.* 2014). Eredményeim a szakirodalmi adatokkal összhangban igazolják, hogy az előzetes hőkondicionálás befolyásolja a hőstresszel kapcsolt markerek kifejeződését.



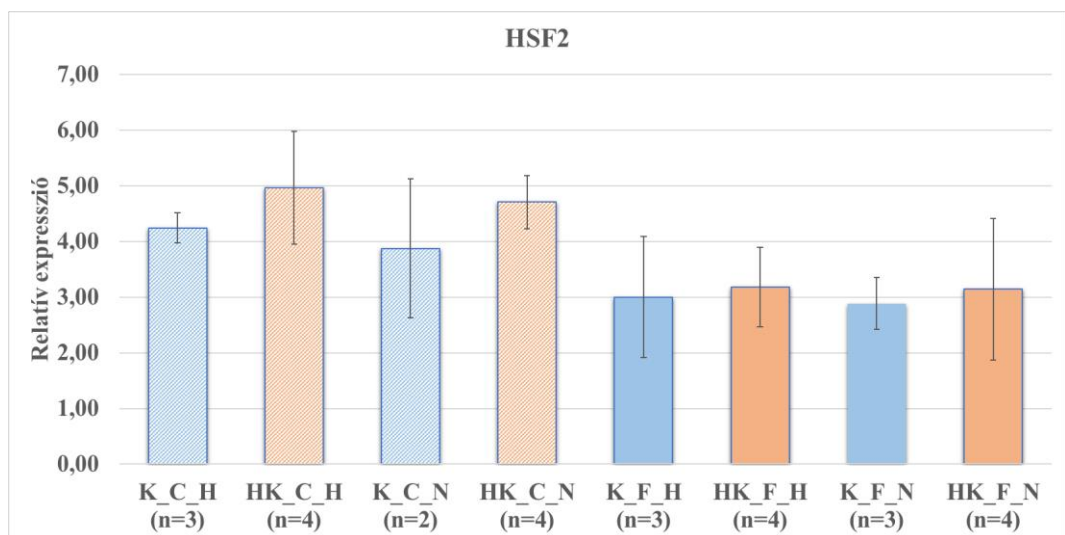
15. ábra: A *HSP70* marker expressziója az egyedi mintákban, amelyek kezelés (K; HK) és ivar szerint (H-hímivarú; N-nőivarú) lettek ábrázolva a csibe és ivarérett korú állatok esetén.



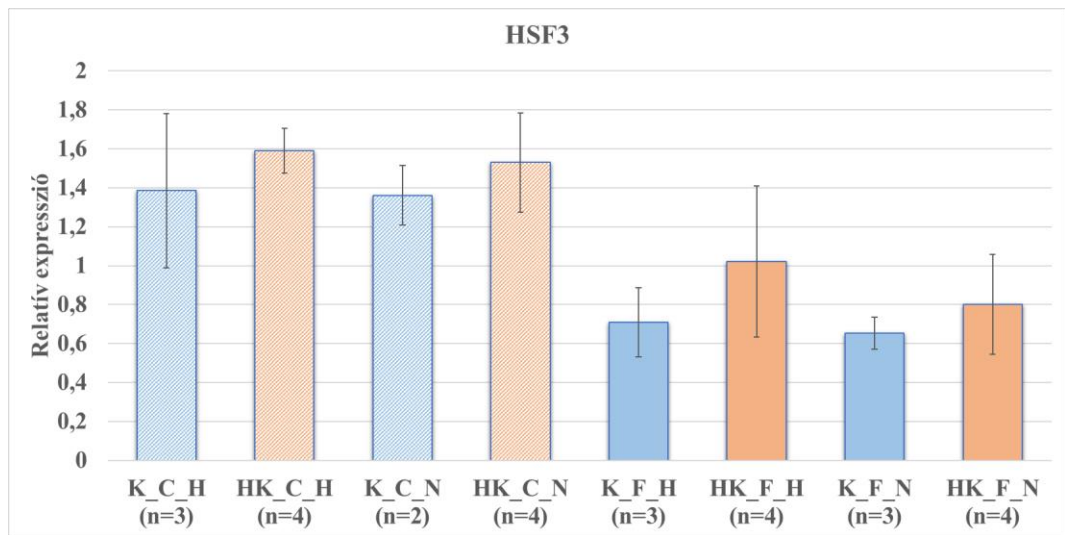
16. ábra: A *HSP90* marker expressziója az egyedi mintákban, amelyek kezelés (K; HK) és ivar szerint (H-hímivarú; N-nőivarú) lettek ábrázolva a csibe és ivarérett korú állatok esetén.



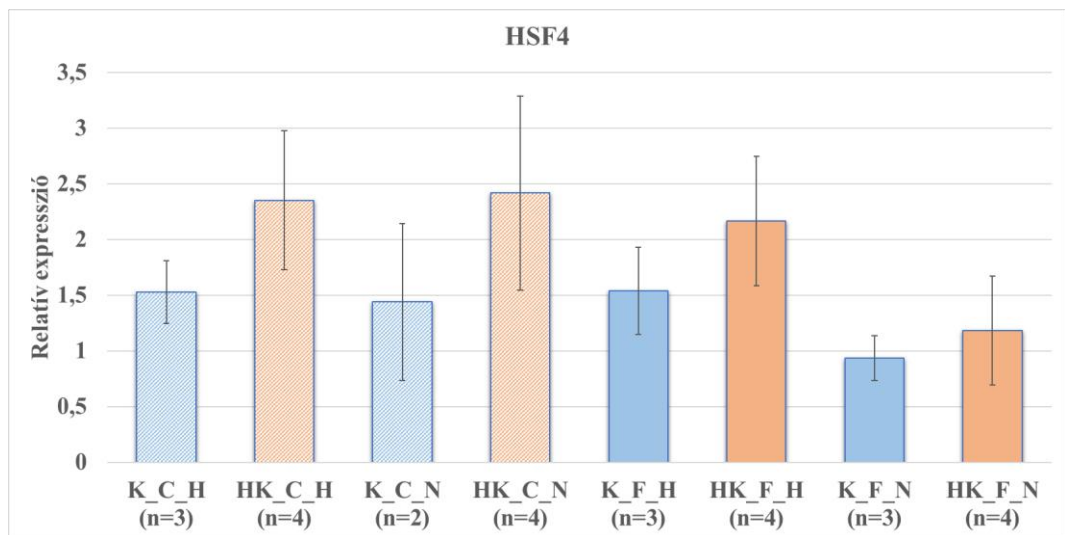
17. ábra: A *HSF1* marker expressziója az egyedi mintákban, amelyek kezelés (K; HK) és ivar szerint (H-hímivarú; N-nőivarú) lettek ábrázolva a csibe és ivarérett korú állatok esetén, ahol a $p < 0,05$ értékeket vettem szignifikánsnak ($*p < 0,05$).



18. ábra: A *HSF2* marker expressziója az egyedi mintákban, amelyek kezelés (K; HK) és ivar szerint (H-hímivarú; N-nőivarú) lettek ábrázolva a csibe és ivarérett korú állatok esetén.



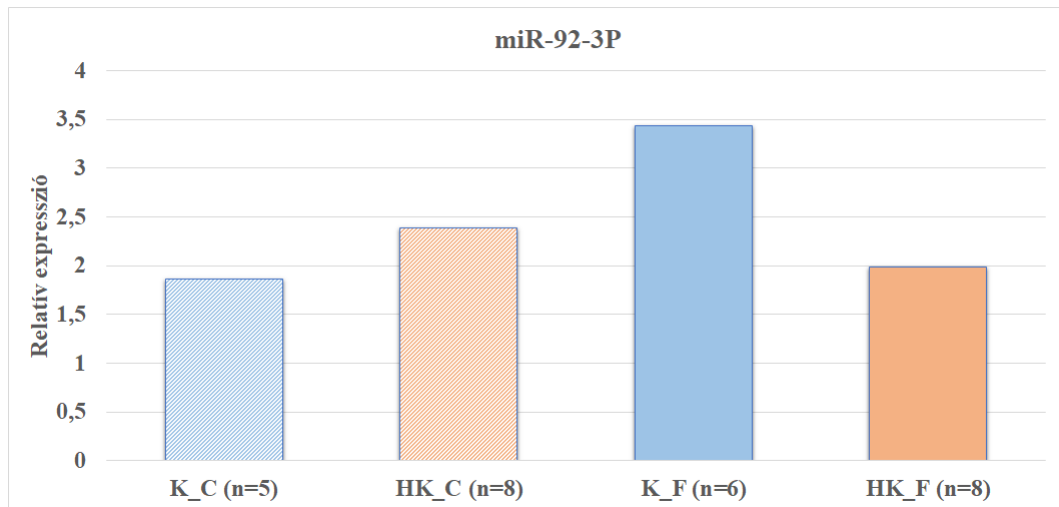
19. ábra: A *HSF3* marker expressziója az egyedi mintákban, amelyek kezelés (K; HK) és ivar szerint (H-hímivarú; N-nőivarú) lettek ábrázolva a csibe és ivarérett korú állatok esetén.



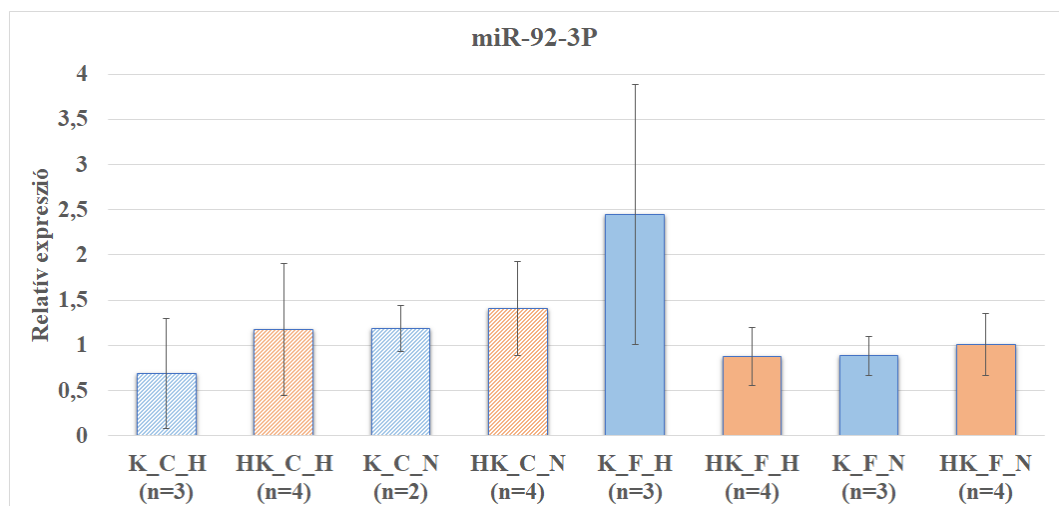
20. ábra: A *HSF4* marker expressziója az egyedi mintákban, amelyek kezelés (K; HK) és ivar szerint (H-hímivarú; N-nőivarú) lettek ábrázolva a csibe és ivarérett korú állatok esetén.

Megvizsgáltam két hőstresszel kapcsolt mikroRNS (miRNS) (miR-92-3P, miR-138-5P) expressziós mintázatát is, kezelt (HK) és nem kezelt (K) csibe (C) és ivarérett/felnőtt (F) háztyúk agyszövetében. A miR-92-3P és a miR-138-5P csökkent expressziója figyelhető meg az ivarérett korú hőkondicionált csoportokban a kontrollhoz viszonyítva (21, 23. ábra). Ahhoz, hogy megtudjam, hogy ezek a különbségek szignifikánsak-e, elvégeztem az analízist ivar szerint poolozott egyedi RNS mintákból is. Ezt követően azt találtam, hogy a miR-138-5P expresszió csak az ivarérett kakasok esetén mutatott szignifikánsan alacsonyabb ($p=0,0043$) szintet a hőkondicionált egyedekénél (HK-F-H), a kontrollhoz (K-F-H) képest (24. ábra). Az

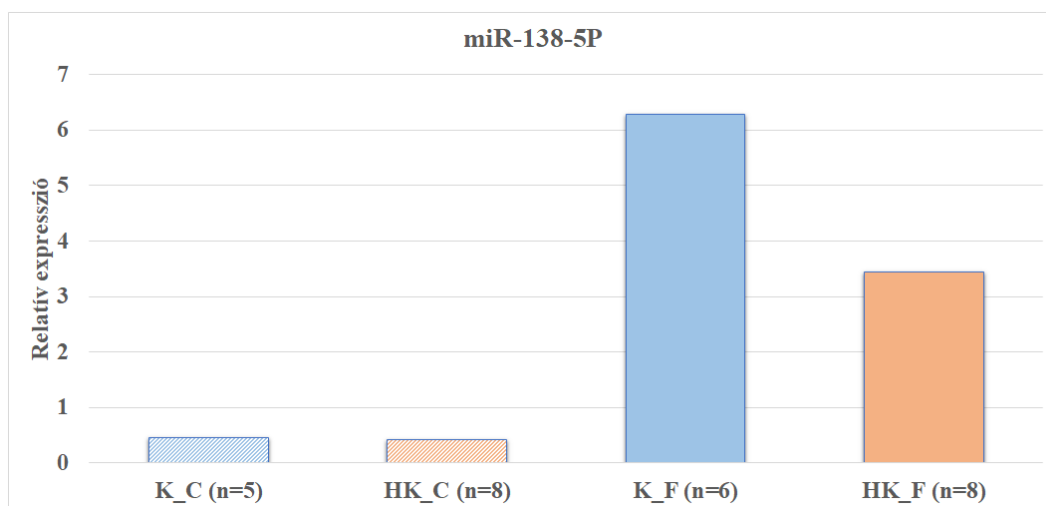
egyedi RNS mintákból készített mérési eredmények jól átfednek a pool RNS mintákkal kapott eredményekkel (Tokodyné Szabadi *et al.* 2024).



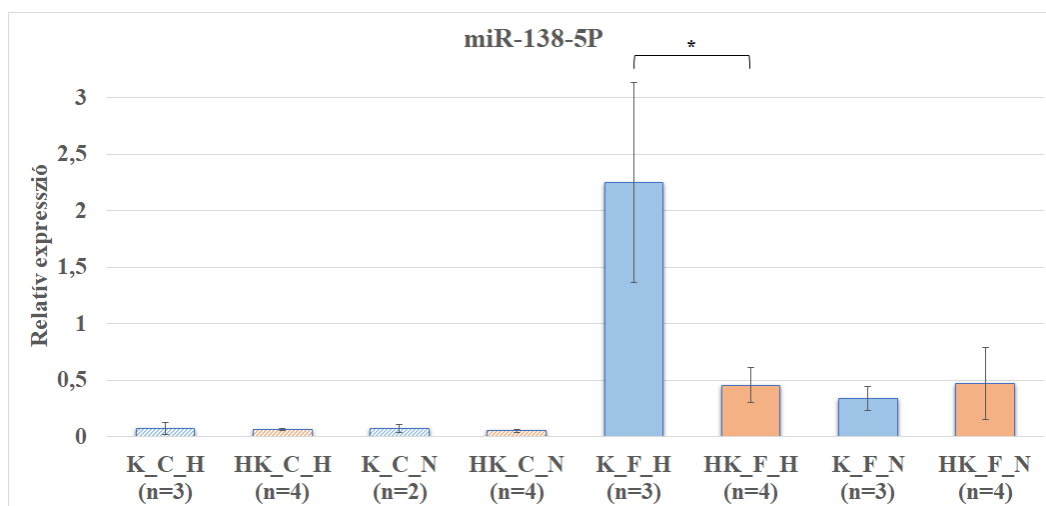
21. ábra. Kezelésenként poolozott (K-kontroll; HK-hőkondicionált) csibe (C) és ivarérett/felnőtt (F) házityúkok agyszövetmintáiban mért miR-92-3P marker expressziója.



22. ábra: A miR-92-3P marker expressziója az egyedi mintákban, amelyek kezelés (K; HK) és ivar szerint (H–hímivarú; N–nőivarú) lettek ábrázolva a csibe és ivarérett korú állatok esetén.



23. ábra. Kezelésenként poolozott (K-kontroll; HK-hőkezelés) csibe (C) és ivarérett/felnőtt (F) házi tyúk agyszövetmintáiban mért miR-138-5P marker expressziója.



24. ábra: A miR-138-5P marker expressziójának értékei az egyedi mintákban, amelyek kezelés (K; HK) és ivar szerint (H-hímivarú; N-nőivarú) lettek ábrázolva a csibe és ivarérett korú állatok esetén, ahol a $p < 0.05$ értéket vettem szignifikánsnak (* $p < 0.05$).

Házi tyúkban a miR-138-5P fő funkciója a testhő szabályozásért felelős jelátviteli útvonal szabályozása. Szakirodalmi adatok alapján a miR-138-5P szerepe a hipotalamikus neurogenesis szabályozásában (Kisliouk *et al.* 2014) alapvető, ugyanis a miR-138-5P kötődik a Reelin (RELN) 3'UTR régiójához, ennek következtében gátolja a RELN expresszióját, ami elősegíti a neuronális sejt vándorlást. Ez a megállapítás magyarázattal szolgál a hőkezelés elvégzésének időzítésére is, mivel madarak esetében fiatal korban még aktív a neuroplaszticitás (Kisliouk *et al.* 2014). A kutatócsoportunk által alkalmazott hőkezelés mellett ki tudtam mutatni a miR-138-5P expressziót a kontroll állatok agyszövetében, amely ivarérett korban

szignifikánsan magasabb (hímivarban $p= 0,00000016$, nőivarban $p= 0,0186$) a csibékhez képest. Az általam vizsgált miRNS-ek expressziós szintje a hőkondicionálás hatására csökken ivarérett korban, ami igazolja a csibe korú hőkondicionálás hatásosságát.

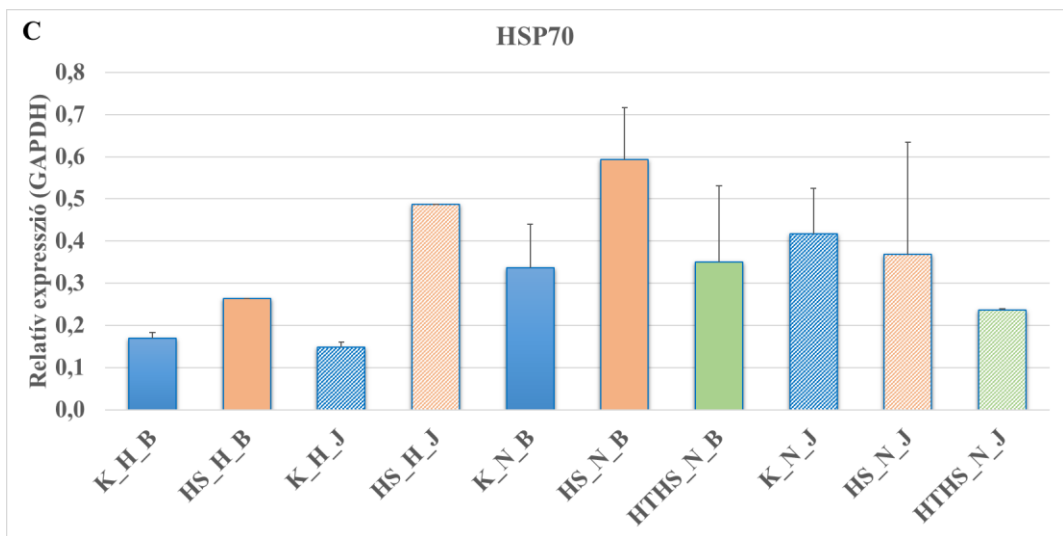
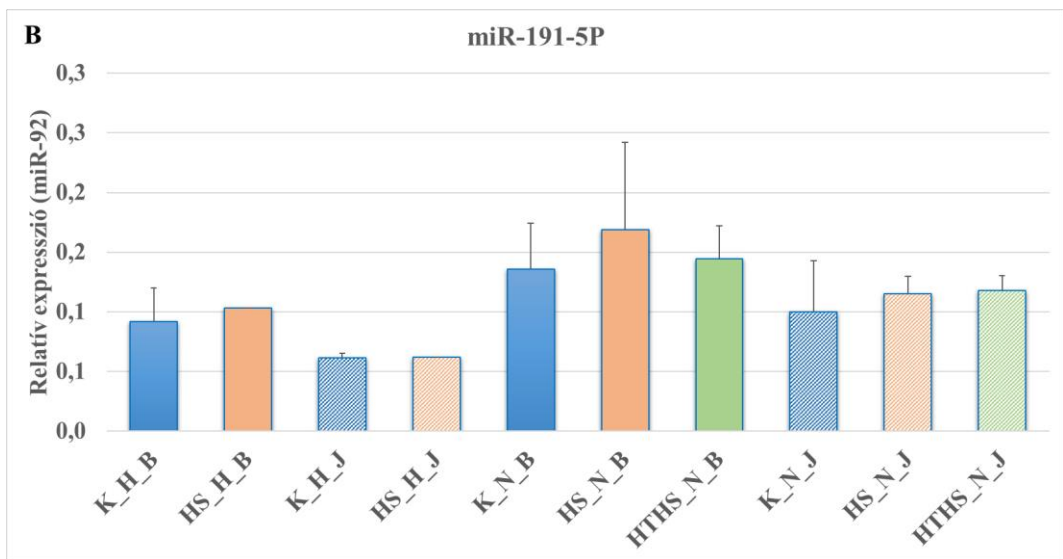
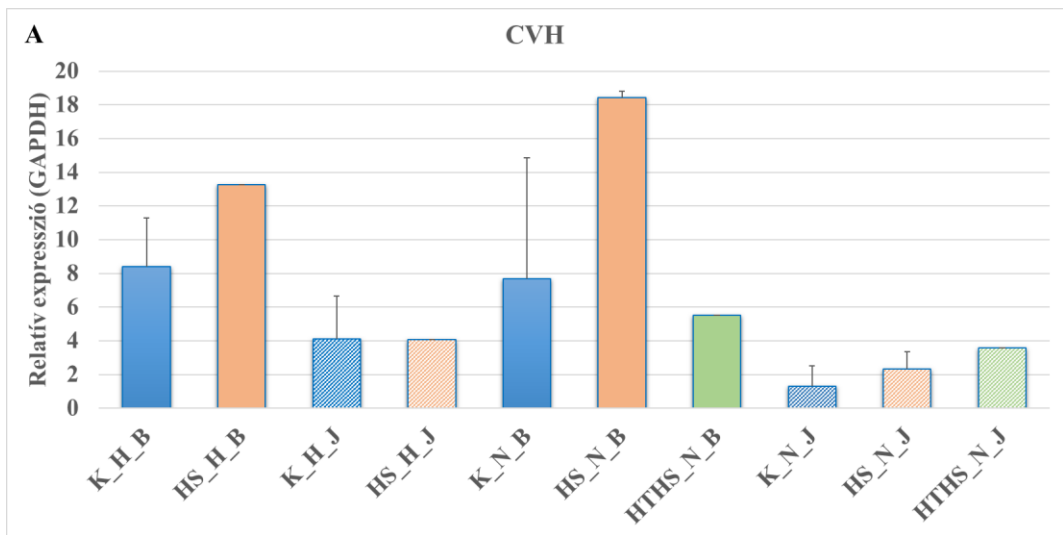
5.2. Utód generáció molekuláris biológiai vizsgálata

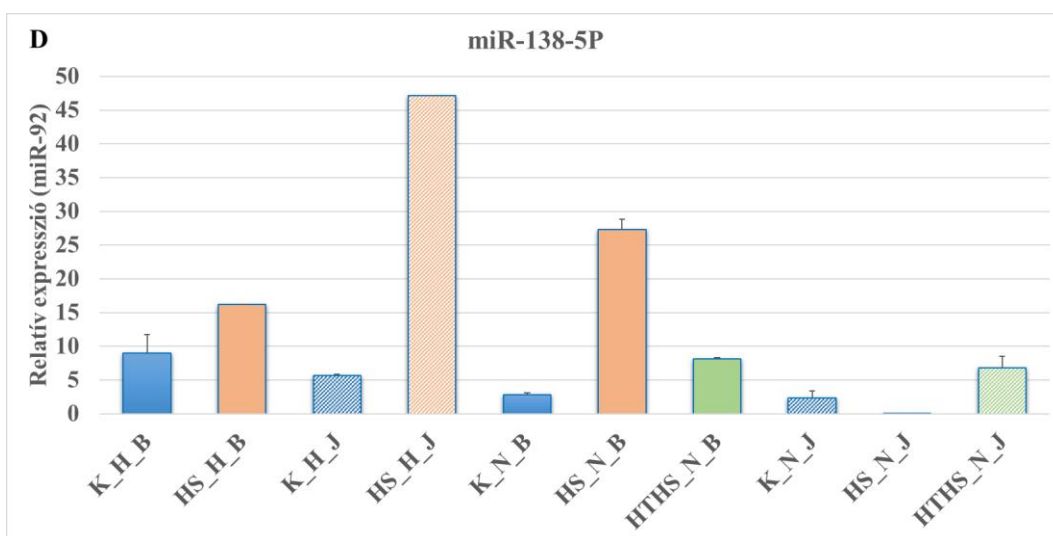
Megvizsgáltam egy ivarsejt-specifikus (*CVH* - *chicken vasa homologue*), egy összejt-specifikus (miR-191-5P) és két hőstresszel kapcsolt (*HSP70*, miR-138-5P) markerek expressziós mintázatát, kezelt és nem kezelt kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkok 10 napos embrióinak ivarszervtelepeiben.

Az összejt- és ivarsejt-specifikus markerek bal/jobbs oldali aszimmetriát mutatnak (25. ábra, A, B). Ugyanis számos gént fedeztek fel, amelyek koordinálják az ivarmirigyek fejlődését, és egyre nagyobb szerepet tulajdonítanak a miRNS-ek részvételének ezekben a folyamatokban is. Ezen gonadális mRNS-ek és miRNS-ek némelyike nemi különbséget mutat az expressziós mintázatban, és az ivar-specifikus fejlődés szabályozói. A gonádok nemi differenciálódása a HH 29-30. stádiumban kezdődik, innentől a nemi különbségek szövettanilag kimutathatók. Nőivarban (ZW) a petefészek differenciálódása a kéreg megvastagodásával kezdődik. Azonban csak a bal gonád fejlődik működőképes petefészekké, a jobb gonád visszafejlődik és kezdetlegessé válik (Smith and Sinclair 2004; Cutting *et al.* 2012).

A *HSP70* és a miR-138-5P emelkedett expressziója figyelhető meg hőstressz esetén a hímivarú bal (HS_H_B) és jobb oldali (HS_H_J) gonádokban, illetve a nőivarúak bal oldali (HS_N_B) gonádjában, ami a nőivar bal gonádjában (HTHS_N_B) mérséklődik hőkezelés hatására (25. ábra, C, D). A nőivar jobb oldali gonádmintáiban az expressziós szintek nem reagálnak a hőhatásokra, ami az embrionális fejlődés során való visszafejlődés következménye lehet.

Ez azt bizonyítja, hogy a hőstressz hatására a *HSP70* expresszió indukálódik. A hőstressz apoptózishoz vezet, ami a gonádsejtek sejthalálához vezethet, de a megnövekedett *HSP70* szint megakadályozhatja a gonádok hőstressz okozta sejtdegenerációját. Ebből arra következtethetünk, hogy a *HSP70* anti-apoptotikus funkcióval rendelkezik, így megakadályozza a hőstressz által kiváltott apoptózist (Anand *et al.* 2016).





25. ábra: Ivarsejt- (A) CVH, össejt-specifikus (B) miR-191-5P és hőstressz kapcsolt (C) HSP70 és (D) miR-138-5P markerek expressziós mintázatának változása kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkfajta hímivarú (H) és nőivarú (N) 10 napos embrió bal (B) és jobb (J) oldali gonád szövetekben.

5.2.1. PGC vonalak alapításának sikeressége a hőkondicionálás függvényében

A hőkezelési kísérletben a PG-sejtvonalak alapítása során rögzítettük a fejlett embriók, az elindult tenyészetek, a 14 napos tenyészetek és a fennmaradt tenyészetek számát. A számadatok alapján elmondható, hogy a HS csoportban 0,7-szer kevesebb, a HTHS csoportban 1,1-szer több volt az életképes embriók aránya a kontroll csoporthoz (K) viszonyítva. A HTHS csoportban közel azonos számú embrióból (22 db) tudunk vért izolálni a PGC-k tenyészetbe viteléhez, mint a kontroll csoport (20 db) esetében. A fennmaradt PGC-vonalak aránya 1,375-ször magasabb volt a HTHS csoportok esetén a HS csoporthoz viszonyítva (3. táblázat). Az állatkísérletben alkalmazott hőkondicionálás javította az életképes embriók számát hőstresszes környezeti körülmények között, hiszen a HTHS csoportban a 47 tojásból 22-ben, a HS csoportban csak 14 db-ban volt embrió. A K csoportban 8 db, a HS csoportban 7 db, míg a HTHS csoportban 11 db PGC vonal maradt fenn, amelyet le tudunk fagyasztani (Tóth *et al.* 2021). Tehát a szülői generációt ért hőhatások befolyásolták az életképes embriók számát és a PGC-vonal alapítás sikerességét is.

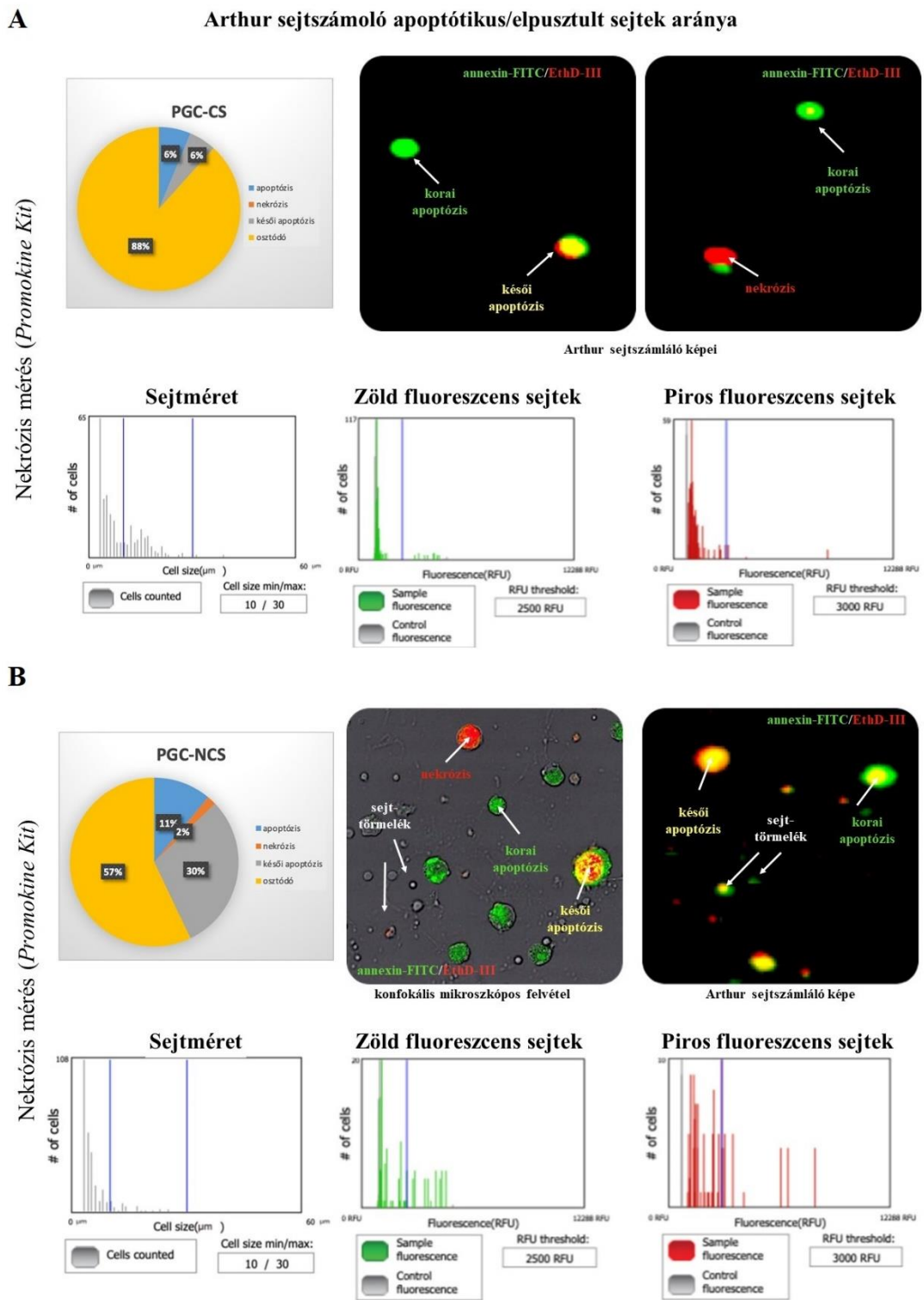
3. táblázat: Életképes embriók és azokból létrehozott PGC vonalak számának alakulása a hőkezelések hatására.

	Kontroll csoport (K)		Hőstresszelt csoport (HS)		Hőkondicionált és hőstresszelt csoport (HTHS)	
	DB	%	DB	%	DB	%
Tojások száma	47	100	47	100	47	100
Fejlett embriók száma	20	42,55	14	29,79	22	46,8
Elindult tenyészetek száma	12	25,53	11	23,4	16	34,04
14 napos tenyészetek száma	8	17,02	8	17,02	12	25,53
Fennmaradt PGC-vonalak száma	8	17,02	7	14,89	11	23,4

5.2.2. Tenyésztési körülmények optimalizálása a PGC karakterizálásának visszaigazolásával

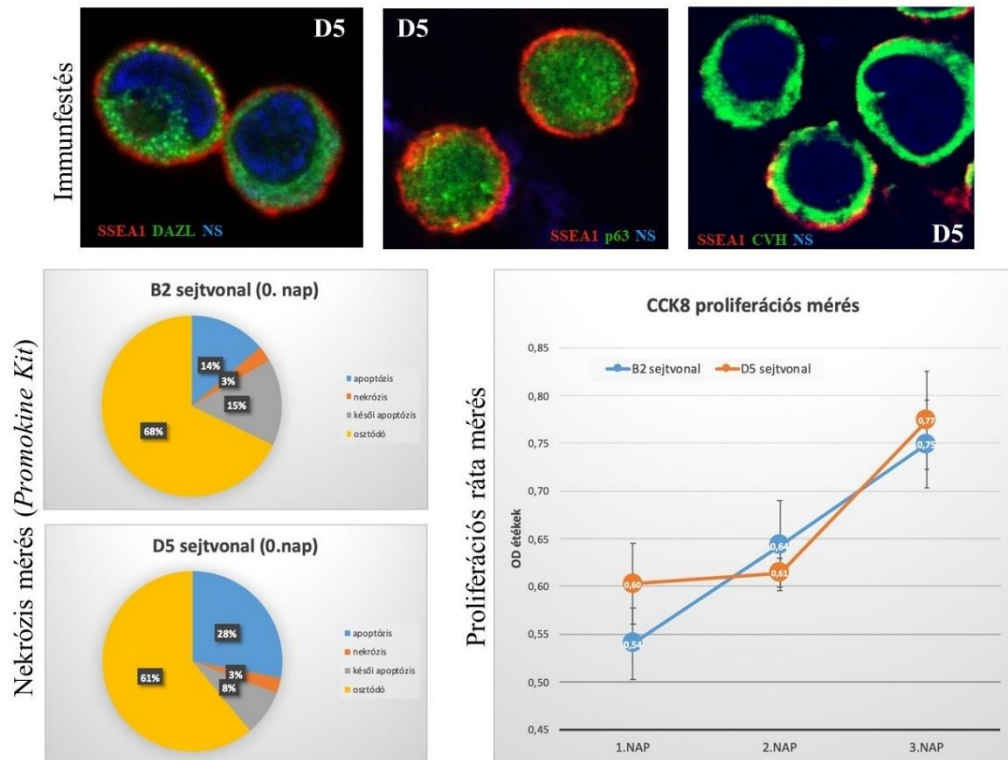
A kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk nőivarú PGC vonalából kiválasztottam egy jól növekedő, magas proliferációs rátával rendelkező sejttenyészetet (B2). Négy lyukba osztottam szét a sejteket. Ezt követően két lyukon cseréltem médiumot, két lyukon pedig nem. Öt nap elteltével nekrozis mérést végeztem *PromoKine Kittet* alkalmazva. Pooloztam a két-két lyukat, amelyben azonos kezelést kapott sejtek voltak. A 26. ábra, A része mutatja be azokat az eredményeket, amiket a médiumcserélt sejttenyészetek esetében kaptam, illetve a 26. ábra, B része azokat, amin nem volt médiumcsere. Arthur sejtszámlálóval határoztam meg az apoptotikus, késő apoptotikus, nekrotikus, illetve a jó PG-sejtek arányát a fluoreszcencia értékek alapján. Miután a készülékkel meghatároztam a különbözően festődő sejtek arányát, a maradék festett sejtszuspenziókból tárgylemezre cseppentettem, majd a kész lemezek elemzését Leica konfokális mikroszkóp (*TCS SP8*) segítségével végeztem. Mind az *ArthurTM* sejtszámláló által készített felvételeken, mind a konfokális mikroszkóppal készített képeken jól látszódtak az eltérő állapotban lévő sejtek. Láthatók voltak zöld apoptotikus, piros nekrotikus és sárga késői apoptózis fázisban lévő sejtek. A friss médiumot kapott, úgynevezett gondozott sejtek esetében magas volt az osztódó sejtek aránya, a sejtek 6-6 %-a volt apoptózis, illetve késői apoptózis fázisában, míg a nekrotikus sejtek aránya nem érte el az 1 %-ot (26. ábra, A). Jól látható, hogy a médium csere elmaradása esetében nagy

mértékben megnőtt a késői apoptózisban lévő sejtek aránya és a nekrotikus sejtek aránya is jóval magasabb, 2 % volt (26. ábra, B).



26. ábra: Kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk embrióiból létrehozott PGC-vonalak jellemzése I. (A) Sejtenyésztés médium cserével és (B) médium csere nélkül. A kördiagramm foglalja össze a nekrozis mérés során kapott sejtszámokat, százalékmintákban kifejezve a gondozott sejteknél és gondozás hiányában, míg a fluoreszcens képeken *Annexin V*-el és *Propidium-jodiddal* festődő eltérő állapotban lévő PGC-k láthatóak.

Ezt követően az előzetes mérési adatok ismeretében, két eltérő proliferációs rátával rendelkező PGC-vonalat választottam ki, egy gyorsan (D5), illetve egy lassan osztódó vonalat (B2). Mindkét sejtvonal esetében kimutatható volt az őssejt-specifikus (*P63*, *SSEA-1*) és ivarsejt-specifikus (*CVH*, *DAZL*) markerek expressziója (27. ábra, Immunfestés). A jól osztódó D5 sejtvonal esetében mért magas apoptotikus sejtarány azonban azt mutatta, hogy a kísérlet kezdetén nem volt ideális a D5 sejtenyészet állapota (27. ábra, Nekrózis mérés).



27. ábra: Kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk embrióiból létrehozott PGC-vonalak jellemzése II. A kördiagrammok foglalják össze a kiindulási sejt számokat az eltérő proliferációjú sejtvonalakban. A vonaldiagramm a három egymást követő nap sejt számait (OD értékből következtetve) ábrázolja a két sejtvonal esetében. Az immunfestés során mindkét sejtvonal esetében kimutatható volt az őssejt-specifikus (*P63*, *SSEA-1*) és ivarsejt-specifikus (*CVH*, *DAZL*) markerek expressziója.

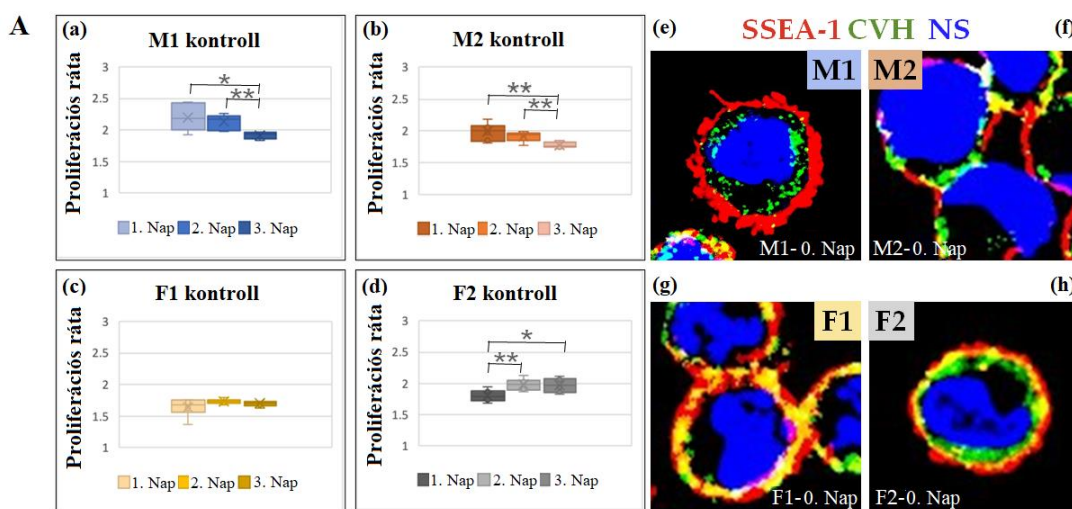
A proliferációs mérés adatai is azt mutatták, hogy az eredetileg gyorsan osztódó sejtvonal (D5) sejtszám növekedése a kísérlet első két napján stagnált a tenyésztőlemez lyukaiban, valószínűleg annak következményeként, hogy a kísérletet megelőzően túl magas lehetett a sejtszám a tenyészetben, ennek következtében mértem a magas apoptotikus sejtarányt a nulladik napon, és ennek hatására időlegesen lelassult a sejtszám növekedés. A fénymikroszkópos megfigyelés alapján jól, de lassabban osztódó sejtvonal (B2) sejtszáma egyenletesen, folyamatosan növekedett az idő előrehaladtával, míg a túl gyorsan növekvő sejtvonal esetében (D5) a sejtszám

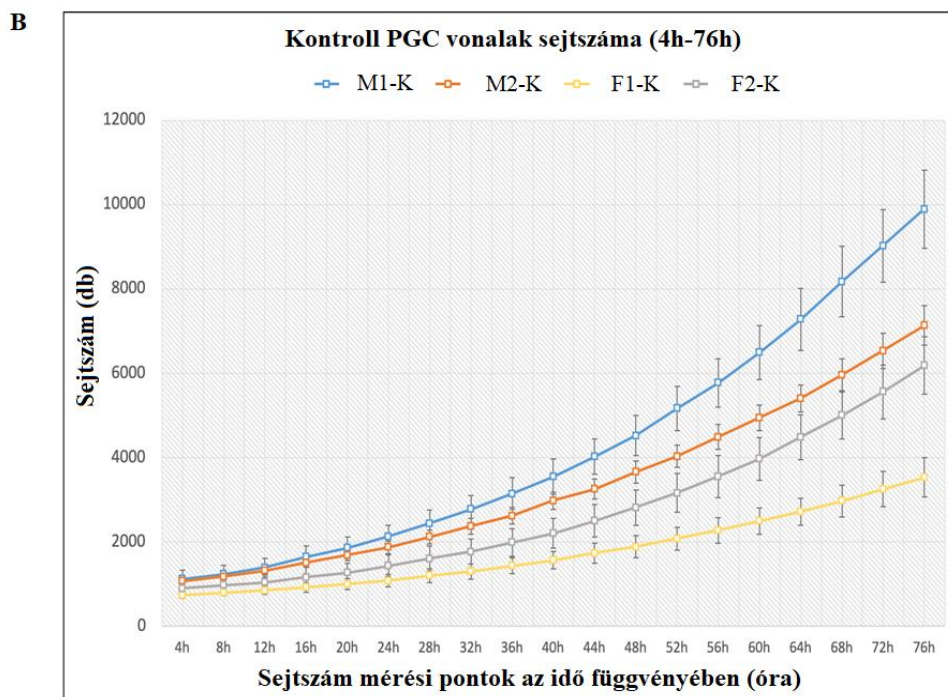
növekedés egy ideig stagnál, de később a sejtek növekedési rátája visszaállt az eredeti szintre, így a sejtszám a mérések végére a két sejtvonal esetében közel azonos lett (27. ábra, Proliferációs ráta mérés).

A PG-sejttenyészetek tanulmányozásával, molekuláris biotechnológiai vizsgálatok elvégzésével kapott eredményeim segíthetik az ősvarsejt-tenyészetek hosszú távú fenntartását. A nekrozis-, és proliferációs mérések statisztikai adatokkal igazolják, az immunfestés vizuálisan teszi láthatóvá a különböző állapotban lévő PG sejteket. A tenyésztési körülmények optimalizálását segíti az általam meghatározott szükséges és elégséges sejtszám, a megfelelő tenyésztési időintervallum függvényében. Nagy sejtszámú megfelelő minőségű tenyészetek mélyhűtésével pedig hozzájárul a hazai házityúk génbank bővítéséhez.

5.2.3. A mikroRNS gátlás hatása PGC-kben

Ebben a vizsgálatban a sejtvonal karakterizáláshoz fekete erdélyi kopasznyakú tyúkfajta két hímivarú (M1: #508-ZZ; M2: #512-ZZ) és két nőivarú (F1: #509-ZW; F2: #513-ZW) PG-sejtvonalát használtam. Ezeknek a sejtvonalaknak a sejtszámát három napon keresztül 4 óránként mérte egy beépített inkubátorral ellátott XLS készülék, *Imaging* rendszerrel. Meg szerettem volna vizsgálni a PGC-k proliferációs sebességét az 1., 2. és 3. napon a gga-miR-302b-5P (5P) vagy gga-miR-302b-3P (3P) gátlása után, illetve anti-gga-miR-302b-5P és anti-gga-miR-302b-3P inhibitorok együttes (5P/3P gátlás) alkalmazását követően. Ehhez először meghatároztam a kontroll csoportok proliferációját az 1., 2. és 3. napon (28/A. ábra, a-d). A sejtszám minden sejtvonal esetében emelkedett a tenyésztési idő alatt (4-76 óra) (28/B. ábra).





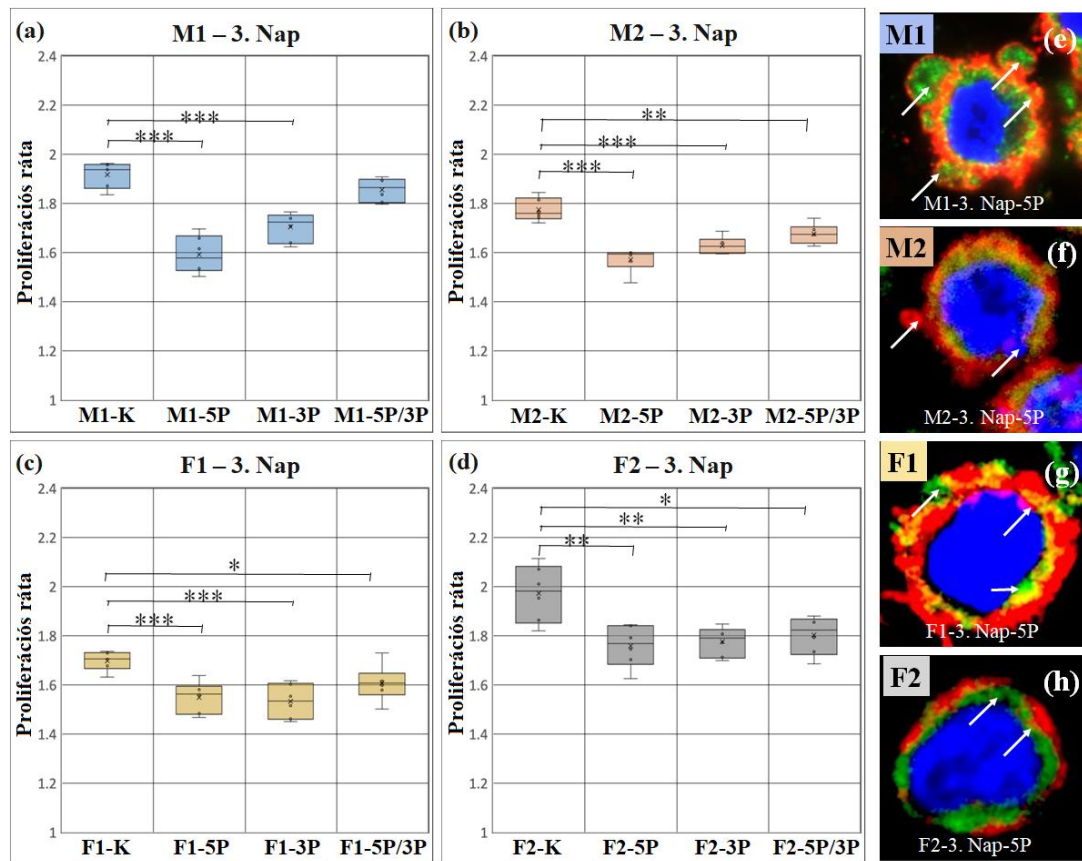
28. ábra (A) A kontroll PGC-vonalak proliferációja az 1., 2. és 3. napon (a-d), valamint a négy vonal immunfestett képei (e-h). (B) Sejtszám alakulása az idő előrehaladtával a kontroll vonalakban. A proliferációs ráta az idő függvényében szignifikánsan változik, ahol $p < 0,05$ érték esetén *, $p < 0,01$ értéknél ** jelölést használtam. Az immunfestést SSEA-1 (piros), CVH (zöld) és TO-PROTM-3-al (kék) végeztem.

Az M1 és M2 (hímivarú, ZZ genotípus) vonalak proliferációja szignifikánsan csökkent a 2. és 3. napon az 1. naphoz képest (28/A. ábra, a, b). A sejtszám az F1 (női, ZW genotípus) (28/A. ábra, c) tenyészetben nem változott, míg az F2 (női, ZW genotípus) (28/A. ábra, d) esetén szignifikánsan nőtt a 2. és 3. napon az 1. naphoz képest. Az immunfestés minden vonalban magas SSEA-1 és CVH expressziót mutatott (28/A. ábra, e-h).

Eredményeim alapján megállapítható, hogy a kísérlet harmadik napján az 5P-vel és 3P-vel való gátlás minden sejtvonal esetében drasztikusan csökkentette a proliferációs rátát a kontrollhoz képest, azonban a gátlás időskálája eltérő volt ezekben a sejtvonalakban. Tehát a 29. ábra a proliferációs ráták összehasonlítását mutatja a 3. napon. Látható, hogy a kontroll minták szignifikánsan nagyobb proliferációt mutattak az M2, F1, F2 esetében (29. ábra, b, c, d) a kezelt mintákhoz képest. Az M1 PGC-k nem mutattak különbséget a kontrollhoz képest az 5P/3P gátlás után (29. ábra, a) (Lázár, Szabadi, *et al.* 2021).

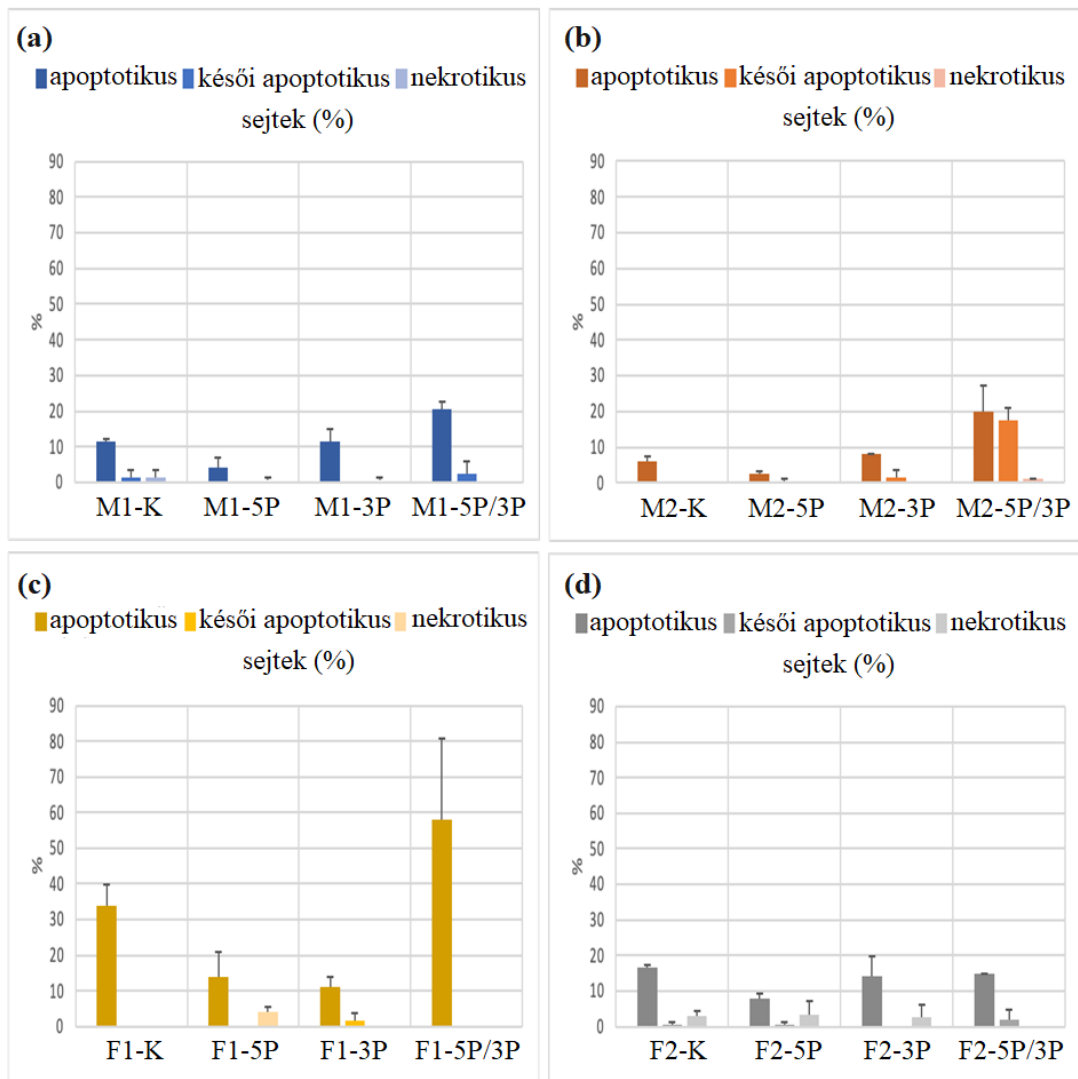
A három napos tenyésztést követően fixáltam a vonalakat és immunfestést végeztem, ami azt is mutatja, hogy a különböző kombinációban gátolt vonalakban

membrándifferenciálódás jelentkezett, amik a festés alapján csak citoplazmát tartalmaznak, tehát ezek citoplazma hólyagosodások, nukleáris degradáció nem volt megfigyelhető. A legtöbb hólyagos sejt az 5P gátlás kezelésnél jelentkezett (29. ábra, e, f, g, h) (Lázár, Szabadi, *et al.* 2021).



29. ábra: Az M1 (a), M2 (b) (ZZ genotípus) és F1 (c), F2 (d) (ZW genotípus) PGC-vonalak proliferációs sebességének összehasonlítása a 3. napon. K: kontroll (nem gátolt), 5P: gga-miR-302b-5P gátlás, 3P: gga-miR-302b-3P gátlás, 5P/3P: gga-miR-302b-5P és gga-miR-302b-3P gátlás. (e) (f) (g) (h) M1, M2, F1 és F2 PGC-k immunfestése anti-gga-miR-302b-5P inhibitort tartalmazó tápközegben háromnapos tenyésztés után. Az immunfestést SSEA-1-gyel (piros), CVH-val (zöld) és TO-PRO™-3 magfestéssel (kék) végeztem. A nyilak a sejtfelszínen lévő hólyagokat mutatják.

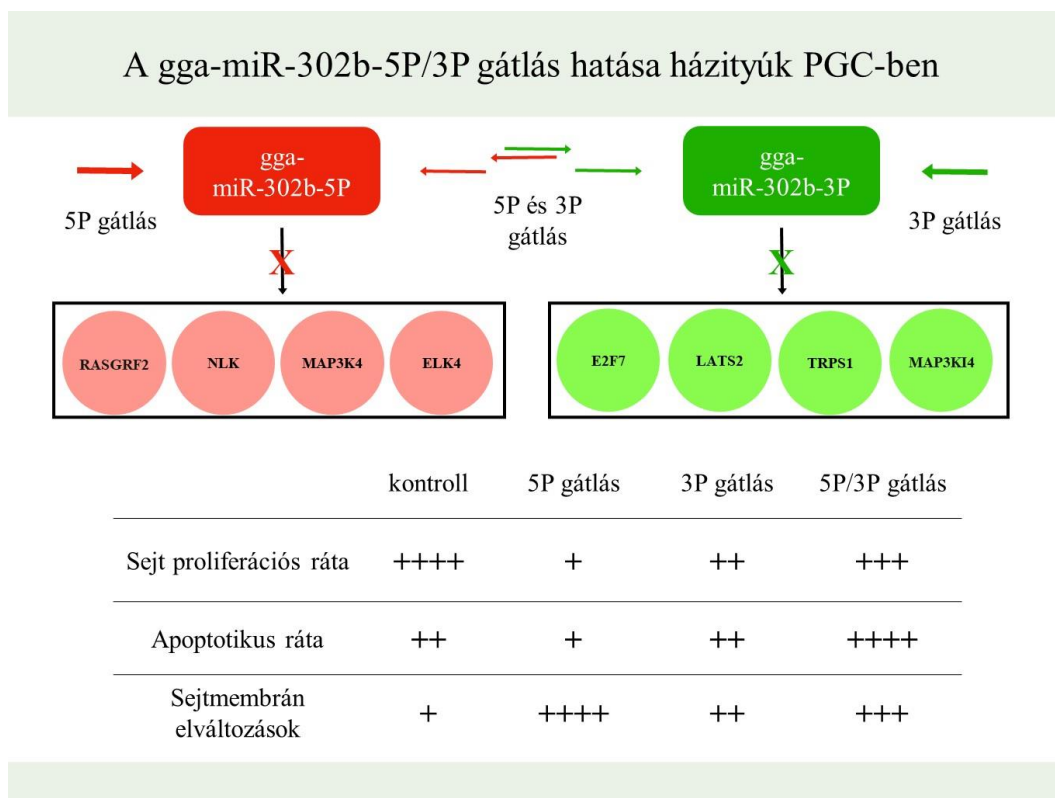
Az apoptózis/nekrózis festést az *Apoptotic Cell Detection Kitten* (Thermo Fisher Scientific), a sejtszámolást az *Arthur Novel Fluorescent Cell Counter* készülék segítségével végeztem. Két párhuzamos mérést alkalmaztam. Az apoptotikus, késői apoptotikus és nekrotikus sejtszámok átlagának arányát a 30. ábra szemlélteti. Azt találtam, hogy az 5P-gátolt PG-sejtek szignifikánsan alacsonyabb apoptotikus arányt mutattak minden sejtvonalban. Az 5P/3P gátlás okozta a sejthalál legnagyobb százalékát. A legmagasabb apoptotikus arányt az F1 sejtvonal esetében találtam.



30. ábra: Az apoptotikus, késői apoptotikus és nekrotikus sejtek százalékos arányának összehasonlítása M1 (a), M2 (b) (ZZ genotípus) és F1 (c), F2 (d) (ZW genotípus) PGC vonalakban.

Kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiban beszámolt arról, hogy a *gga-miR-302b-5P* magasabb expressziót mutatott a *gga-miR-302b-3P*-hez képest a magasabb proliferációs rátával rendelkező sejtek esetében (Lázár *et al.* 2018). Erre az információra alapozva folytattam munkámat, amiben azt találtam, hogy a *miR-302b-5P* kar gátlása szignifikánsan csökkentette a proliferációt, ami a *miR-302b-5P* szerepére utal a sejtproliferációban. A *gga-miR-302b-5P*-vel gátolt sejtek esetében az apoptotikus sejtek aránya alacsonyabb volt, mint a kettős gátlást kapó sejtek esetében ez tapasztalható volt (Lázár, Szabadi, *et al.* 2021). Ez az eredmény összhangban van korábbi szakirodalmi adatokkal (Wu *et al.* 2019), ahol a *miR-302b-5P* proliferációs promoterként és oncomiRként működött. A *miR-302b-5P* gátlása csökkentette a proliferációs rátát és mérsékelte az apoptotikus sejtek arányát. Ez igazolja a *miR-302b-5P* miRNS szerepét a PGC-k *in vitro* és *in vivo* proliferációjának szabályozásában.

Összeségében eredményeim megerősítették a proliferációs ráta csökkenését a gga-miR-302b-5P és gga-miR-302b-3P gátlása után (31. ábra).

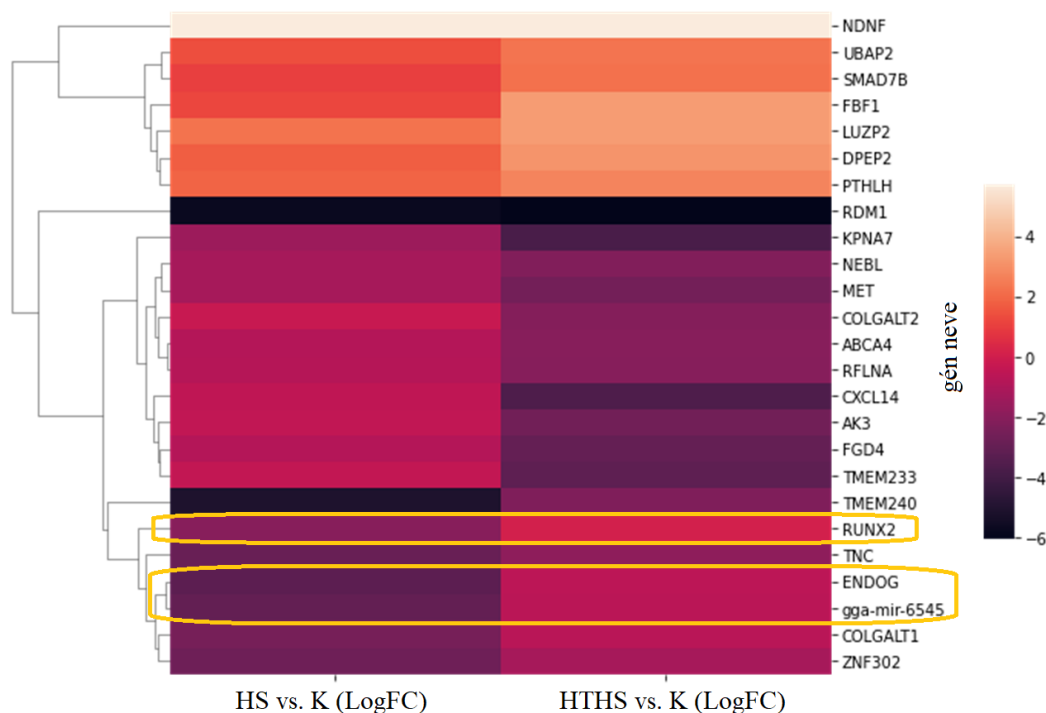


31. ábra: A gga-miR-302b-5P és gga-miR-302b-3P legrelevánsabb célgénjei, korábban közölt adatok alapján (Cataldo és mtsai., 2016; Lázár és mtsai., 2018; Sun és mtsai., 2015).

5.2.4. Hőkezelt házityúkok embrióiból alapított PGC-k molekuláris diagnosztikai felhasználása a jelátviteli útvonalak feltárásához

A kutatócsoportunk által alapított kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk eredetű PGC-vonalakat kutatásomban molekuláris diagnosztikai vizsgálatokhoz használtam fel. A PGC-kből származó RNS mintákat kezelési csoportonként pooloztam, majd megszekvenáltattuk. Az eredményeket összegző *heat map* ábra az RNS szekvenálással detektált, stresszválaszban megváltozott expressziójú géneket tartalmazza. Ahol a bal oldali oszlop a hőstresszelt csoportból (HS) származó PGC mintákban mért expressziós értékeket színintenzitással jelzi a kontroll (K) értékekhez viszonyítva, míg a jobb oldali oszlop a hőkondicionált és hőstresszelt csoportból (HTHS) létrehozott PGC minták adatait szintén a kontrollhoz (K) viszonyítva. A világos szín az adott gén esetében kimutatott expressziós szint növekedését, a sötét szín az expressziós szint csökkenését jelzi (32. ábra). RNS szekvenálással több olyan

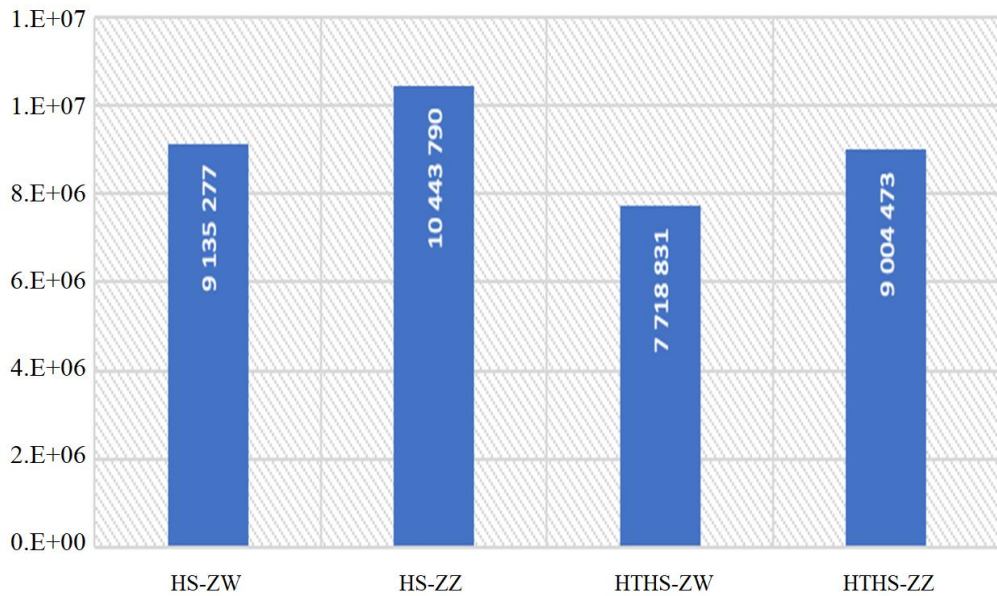
gén esetében is kaptunk expressziós szintváltozást, amelyek a szakirodalmi adatok alapján (Tavares *et al.* 2018) is fontos szerepet játszanak a hőstressz során aktiválódó molekuláris folyamatokban. A miR-6545, a *RUNX2* és *ENDOG*, amelyek eltérő mértékben expresszálódnak a hőkondicionált, majd hőstresszelt házityúk, illetve csak hőstresszelt állatok embrióiból származó PG-sejttenyészetekben. Elmondható, hogy a kutatócsoportunk által alkalmazott hőhatás, illetve hőhatások változtatták meg a génextpressziós mintázatot.



32. ábra: RNS szekvenálási adatok heat map ábrája.

A PGC-kból származó DNS mintákat kezelési csoportonként és ivarok szerint pooloztam, majd elküldtük teljes genom biszulfid metilációs szekvenálás analízisre (WGBS). A visszaérkező eredményekből először az ivarok szerinti kezelési csoportok DNS metilációját határoztam meg, ami a DNS citozin-guanin dinukleotidjainak (CpG) citozinját érinti. A metilált citozinok döntő része az 5'-citozin-guanin-3' palindrom dinukleotid formájában található meg, ezeknek a számát vizsgáltam meg a mintákban (33. ábra). Ezt követően megvizsgáltam a CpG lefedettségét és metilációs arányát a kezelési csoportokban HS és HTHS, női ivar (ZW) és hímivar (ZZ) esetén is. Az eredmények alapján elmondható, hogy a HTHS csoportban alacsonyabb a CpG lefedettség és a metilációs szint is.

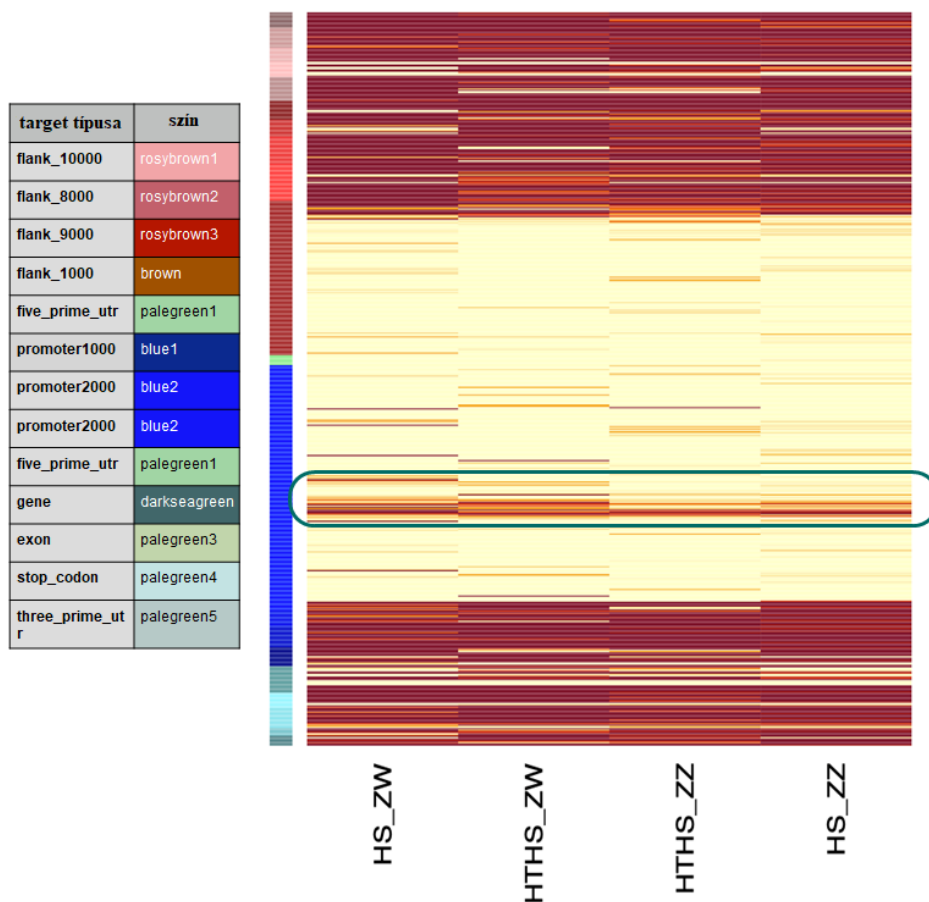
WGBS - CpG szám a PGC mintákban



33. ábra: Kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk eredetű PGC-vonalak teljes genom biszulfid metilációs szekvenálás (WGBS) eredményeként kapott CpG metilációs értékek (darab szám) a kezelési csoportokban (HS, HTHS) ivarok szerint (ZW, ZZ).

Az RNS szekvenálás alapján a miR-6545 expresszióját befolyásolja a hőkondicionálás. A miR-6545-nek target helye van a *DMRT1* génen (Prastowo and Ratriyanto 2021), tehát jelenléte vagy hiánya hatással van ezen gén kifejeződésére. Ezek alapján megvizsgáltam a *DMRT1* gén genomi régiójának metilációs mintázatát. A *heat map* ábrán a *DMRT1* metilációs mintázata kezelésenként és ivar szerinti poolok esetében vannak feltüntetve, ahol a vörös részek erősen metiláltak, míg a sárga régiókon aktív a génátírás. Jól látható, hogy különbség van a metilezettség mértékében a gén promóter régiójában, a hímivarnál kétszeres a génexpresszió a nőivarúakkal szemben, amit a gén lokalizációja is megerősít, mivel a *DMRT1* gén a Z ivari kromoszómán található. Valamint a HTHS csoportban alacsonyabb a metilezettség a HS csoportokhoz képest, tehát a HTHS csoportban magasabb a *DMRT1* gén expressziója (34. ábra).

DMRT1



34. ábra: A WGBS analízis során kapott metilációs mintázat a *DMRT1* genomi régióban, a kezelési csoportokban (HS, HTHS) ivarok szerint (ZW, ZZ).

Az, hogy az utódokban megjelenő genetikai változások ténylegesen epigenetikai öröklődés eredménye, további molekuláris biotechnológiai módszerekkel való megerősítést tett szükségessé. Ennélfogva megvizsgáltam számos fejlődés-specifikus (miR-92-3P, miR6545, *DMRT1*) és hőstresszel kapcsolt (miR-138-5P) marker metilációs mintázatát a kísérletben részt vett házityúkok utód generációjából alapított PGC-tenyészetek DNS mintáinak teljes genom biszulfid metilációs szekvenálással kapott adatokban. Több gén esetében is eltérést találtam a CpG metilációs mintázatban (miR-92-3P, miR-138-5P, miR-6545, *DMRT1*), amelyekről már vannak szakirodalmi adatok, hogy szerepet játszanak az embrionális fejlődést szabályzó folyamatokban és a hőstressz által aktivált molekuláris jelátviteli útvonalakban (Tavares *et al.* 2018). Mások a miRNS-ek és mRNS targeteik kapcsolatát írták le adatbázis elemzéseket követően, és azt találták, hogy számos miRNS-nek (4. táblázat) target helye van a házityúk *DMRT1* génen (Dunislawska *et al.* 2021; Prastowo and Ratriyanto 2021).

Ebből a listából a mi kísérleti mintáinkban a miR-92-3P, a miR-138-5P és miR-6545 esetében találtunk metilációs mintázatbeli változást.

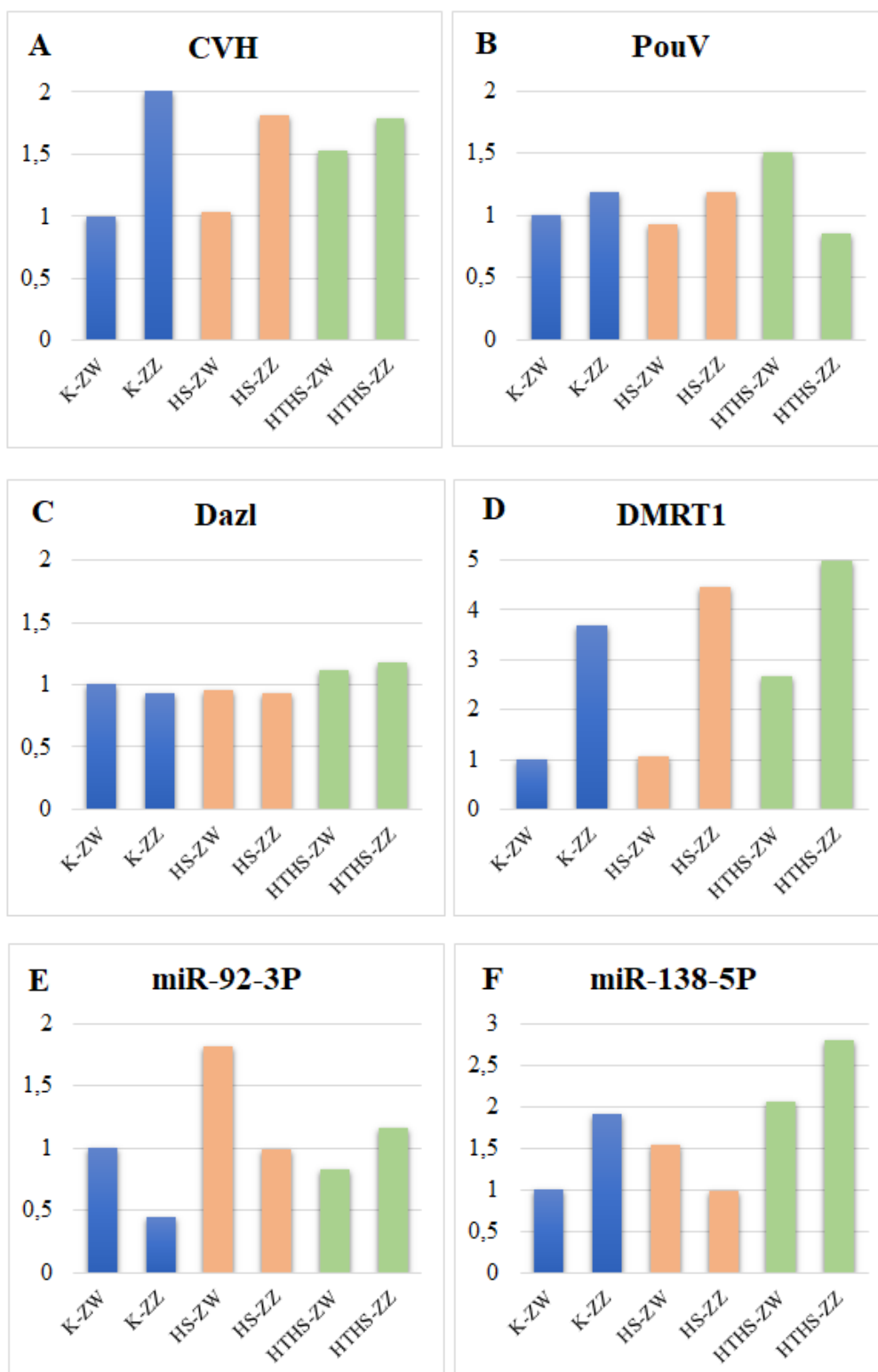
4. táblázat: S. Prastowo és A. Ratriyanto által vizsgált adatbázisokban *DMRT1* gén esetében prediktált miRNS-ek listája (Prastowo & Ratriyanto, 2021).

Adatbázis	Teljes predikció (db)	miRNS neve
TargetScan - miRDB	1	gga-miR-6701-3p
miRDB - microT-CDS	1	gga-miR-7438-5p
TargetScan - microT-CDS	6	gga-miR-6562-3p; gga-miR-138-2-3p ; gga-miR-1781-5p; gga-miR-1580; gga-miR-153-5p; gga-miR-1728-3p
TargetScan	31	gga-miR-6684-5p; gga-miR-367; gga-miR-1630; gga-miR-1591-3p; gga-miR-92-3p ; gga-miR-6588-3p; gga-miR-6570-3p; gga-miR-6545-5p ; gga-miR-1715-3p; gga-miR-1769-5p; gga-miR-6680-3p; gga-miR-1581; gga-miR-32-5p; gga-miR-1687-3p; gga-miR-194; gga-miR-6706-5p; gga-miR-6641-3p; gga-miR-6581-5p; gga-miR-20b-3p; gga-miR-6649-3p; gga-miR-1654; gga-miR-6633-5p; gga-miR-30e-3p; gga-miR-6574-3p; gga-miR-1564-5p; gga-miR-200a-3p; gga-miR-1457; gga-miR-7469-5p; gga-miR-1687-5p; gga-miR-1811; gga-miR-6663-5p

Az RNS szekvenálás és WGBS eredményeit qPCR elemzésekkel és szakirodalomban leírt adatokkal is megerősítettem, ami alapján elmondható, hogy a miR-6545 befolyásolja a *DMRT1* kifejeződését, míg a miR-138-5P jelenléte hatással van a *RUNX2* expressziójára (Kisliouk *et al.* 2011; Tavares *et al.* 2018; Prastowo and Ratriyanto 2021).

Megvizsgáltam ivarsejt-specifikus (*CVH*, *PouV*, *Dazl*) markerek, illetve hőstresszel kapcsolt (miR-302b-3P, miR-302b-5P, miR-213, miR-U6, miR-92-3P, miR-138-5P, *DMRT1*) markerek expressziós mintázatát a kísérletben részt vett házityúk utód generációjából alapított PGC-tenyészetekben. A *CVH* (35. ábra, A) és *PouV* (35. ábra, B) markerek expressziója ivari különbséget mutatott, míg a *Dazl* (35. ábra, C) egyenletes kifejeződését találtam minden csoportban, mindkét nemben. A hőhatás által befolyásolt gének közül a miR-92-3P, miR-138-5P és a *DMRT1* (35. ábra, D, E, F) esetében expressziós szintváltozást találtam. Ezen expressziós

szintváltozások szignifikáns eltéréseinek megerősítésére további vizsgálatokra van szükség.



35. ábra: A hőkezelési kísérletben részt vett háztyúkrok utód generációjából alapított PGC-tenyészetekben vizsgált ivarsejt-specifikus markerek (a) *CVH*, (b) *PouV*, (c) *Dazl*, illetve hőstresszel kapcsolt (d) *DMRT1*, (e) *miR-92-3P* és (f) *miR-138-5P* markerek expressziós mintázatát összefoglaló oszlopdiagrammok.

6. Következtetések és javaslatok

A baromfihús fogyasztása évről-évre a globális húsfogyasztás egyre nagyobb hányadát teszi ki. A megnövekedett piaci igények kielégítése céljából, egyre gyorsabban növekedő és nagyobb húshozamú fajták kerülnek a piacra. Ezzel párhuzamosan az új fajták globális klímaváltozás következtében a megemelkedett környezeti hőmérséklettel szembeni ellenállóképessége drasztikusan lecsökkent. A magas környezeti hőmérséklet esetében a húsminőség romlik, termékenység és tojásmennyiség csökkenése, illetve az állomány elhullása következhet be, ami egyre súlyosabb veszteségeket generál a baromfiágazatban. A hőstresszről szóló szakirodalom jelentősebb része a közvetett védekezési stratégiákra összpontosít, a tartástechnológia optimalizálása és táplálékkiegészítők alkalmazásának hatásait elemzik (Benton *et al.* 1998; Dagher 2009; Sahin *et al.* 2009; Ghazi *et al.* 2012; Varasteh *et al.* 2015). Ezeknek a hatékonysága nagyon változó, befolyásolja a földrajzi elhelyezkedés, nem alkalmazható egy egységes protokoll a különböző fajták esetében.

A közelmúltban újabb módszerek is előtérbe kerültek, ideértve a baromfifajták genetikai marker alapú kiválasztását. A molekuláris technikák használata a baromfitenyésztésben egy fenntartható gazdaságot eredményezhet (Cahaner *et al.* 1992; Deeb *et al.* 1993; Deeb and Cahaner 2002; Rajkumar *et al.* 2011; Felver-Gant *et al.* 2012). Például a FRIZZLE gén domináns gén, amely csökkenti a tollnövekedés intenzitását (Cahaner *et al.* 1996). A tollak szerkezete megváltozik, alakjuk görbült és keskenyebb lesz, ezáltal növelve a madarak bőrének hőelvezető képességét.

A brojlerek gazdasági szempontból hasznos, megemelkedett húshozam fenntartását gátolja a magas hőmérséklet. A hőstressz negatív hatásának a kivédését nemcsak a tolltömeg csökkenése és alakja által javított hőleadás, hanem a tollépítő fehérjék csökkent működése is segíti, mert az így felborult kapacitás az izomtömeg építésére fordítható (Cahaner *et al.* 2008).

Továbbá, ha „kopasz nyak” (*NA*) gén és FRIZZLE gén kettős heterozigóta additív hatású brojlerben, tovább javította a hőleadást, megtartva a brojler fajta magas növekedési rátáját a trópusi éghajlaton is (Deeb and Cahaner 2002; Fathi *et al.* 2013).

A biotechnológia, illetve genomika területén zajló fejlesztések egyre inkább elősegítik a gyakorlatban zajló tenyésztőmunka sikerességét. Napjainkban már rendelkezésünkre áll a teljes tyúk genom szekvencia, több millió, már azonosított egyedi nukleotid polimorfizmussal (Hillier 2004; Wong 2004). Azonban fontos

megjegyezni, hogy a genomanalízisek nem fogják kiváltani a hagyományos szelekciós módszereket, sokkal inkább a kettő szoros együttműködését teszik lehetővé a hatékonyság növelésével. Az innovációra, mint lehetőségre kell tekinteni, ami akár egy jól működő hálózattá kovácsolhatná a vállalkozás – oktatás – kutatás és fejlesztés intézményeit (Horn 2008).

A molekuláris biológiai eszközök elősegítik a jelátviteli útvonalak, élettani folyamatok és immunválaszok megértését, ami segítheti a fajták jobb adaptációját a változó éghajlathoz (Borges *et al.* 2004; Cheng *et al.* 2015; Wang *et al.* 2015).

Hőstresszre aktiválódó válaszreakciókban a HSP-k szerepe már bizonyított. A HSP-k expressziója növekszik, fehérjekárosodás megakadályozására irányuló jelátviteli utakat indukál (Xie *et al.* 2014; Zhang *et al.* 2014; Murugesan *et al.* 2017). A legújabb kutatások kiemelik az epigenetika adaptációs előnyeit (Deans and Maggert 2015; Li *et al.* 2015) a hőkondicionálás során (Kisliouk *et al.* 2017), azonban ennek a kezelésnek az optimalizálásához még további kísérletekre van szükség, illetve a HSP-k és más a hőszabályozásban szerepet játszó molekuláris jelátviteli útvonalak közötti kölcsönhatás részletesebb megismerése is fontos. Ezt követően lehetséges lenne egy minden fajtára egységesen alkalmazható eljárás kidolgozására.

A szakirodalomban már több különböző kombinációban alkalmaztak hőkezelést, alkalmaztak magasabb hőmérsékletet, de azt találták, hogy az már inkább hőstressz (Kisliouk *et al.* 2014). Alkalmazták korábbi időintervallumban pl.: még tojásban, a keltetési hőmérséklet emelésével, ez azonban nem volt elég eredményes (Loyau *et al.* 2016). Azt is leírták, hogy ha lépcsőzetesen emelik a hőmérsékletet, nincs jelentős eltérés az egyszeri hőkezeléssel elért hatáshoz viszonyítva (Xie *et al.* 2014).

Korábbi kutatásaink eredményei alapján elmondható, hogy a reprodukív tulajdonságok a kontrollhoz képest kevésbé romlottak hőstressz esetén, ha előzőleg hőkondicionálást alkalmaztunk. A tojástermelés aránya is szignifikánsan magasabb volt a hőkondicionált csoportban hőstressz esetében, mint azoknál az állatoknál, amelyek csak hőstresszen estek át (Anand *et al.* 2016; Tóth *et al.* 2021). Kutatásaim során megerősítettem azon állítást, miszerint a hőkondicionálás javítja az életképes embriók arányát a házityúkokat ért hőstresszes körülmények között.

Úgy gondolom, hogy a miRNS-ek kifejeződési mintázatában a hőkezelés hatására létrejövő változások közvetlen információval szolgálhatnak az állatok adaptációs képességének hátterében meghúzódó molekuláris folyamatokról (Gebert and MacRae 2019; Safdar and Özasan 2023). Ezek az eredmények alátámasztják a

fiatal korban történő hőkezelés fontosságát. Tehát a hőkezelési eljárás optimalizálásával javíthatjuk a házityúk adaptációs képességét.

A házityúk primordiális csírasejtek (PGC) a kialakuló embriókorong központi régiójában található. Az első csírasejt-populáció a fejlődés során, amelyek a petesejtek és a spermatogóniumok prekursorai. A PGC-k sejtproliferációját befolyásoló tényezők vizsgálatával nyert információk hozzájárulhatnak az őssejtbiológiában számos folyamat megértéséhez (Cai *et al.* 2015).

A PGC-k karakterizálásához megvizsgáltam az őssejt specifikus miR-302b-5P és miR-302b-3P sejtproliferációra és apoptózisra gyakorolt hatását, miRNS gátláson alapuló technika alkalmazásával. A miR-302 klaszter embrionális őssejt-specifikus és evolúciósan konzervált a gerincesekben. A miR-302/367 klaszter öt tagból áll, a miR-367, miR-302d, miR-302a, miR-302c és miR-302b, mindenütt megtalálható a gerincesekben, és egy intragén klasztert foglal el, amely az LA-val kapcsolatos protein 7 (*LARP7/Larp7*) gén 8-as intronjában található antiszensz irányban (Lee *et al.* 2011). A klaszter létfontosságú szerepet játszik különféle biológiai folyamatokban, például a humán embrionális őssejtek (hESC) pluripotenciájában, az önmegejülésben és az újraprogramozásban is (Lázár *et al.* 2018; Maraghechi *et al.* 2023). Szakirodalomban leírták, hogy a miR-302 endogén módon expresszálódik humán embrionális őssejtekben (hESC) és humán indukálta pluripotens őssejtekben (hiPSC). A miR-302 antagomirokkal (anti-miR) történő gátlása a hESC-k, hiPSC-k önmegejülési sebességének csökkenését eredményezte, amit sejtkolónia-képződést detektáló assay-t alkalmazva igazoltak (Wu *et al.* 2019).

Napjainkban egyre több kutatás irányul az akklimatizációs tulajdonság örökölhetőségének meghatározására, ami az ivarsejtekben létrejövő epigenetikai változások átadásán keresztül valósulhat meg. A PG-sejttenyészetek karakterizálásával, lehetőség nyílna ezeknek az epigenetikai módosulásoknak a feltárására, ami magyarázattal szolgálhat a generációkon átadódó adaptációs képességről (Kisliouk *et al.* 2017; Vinoth *et al.* 2018; Dunislawska *et al.* 2021; Prastowo and Ratriyanto 2021).

Az adaptációt több gén is befolyásolja, vannak dominánsan és recesszíven öröklődő gének is. Vannak gének, amelyek nemhez kötötten öröklődnek, mint az általam is kiemelt DMRT1 gén. A DMRT1 gén a Z ivari kromoszómán helyezkedik el (Prastowo and Ratriyanto 2021), így a női vonalon néhány generációt követően csökken az állomány adaptációs képessége ismételt hőkezelés nélkül.

Mivel ezen képesség örökölhetőségét a metilációs mintázat vizsgálatokban is igazoltuk, úgy gondoljuk, hogy epigenetikai öröklődés lehet az öröklődés meghatározója. Az epigenetikai mintázatot az egyedi élet folyamán is sok paraméter befolyásolja. Hiába mutatható ki több generáción keresztül a kezelés hatására kialakuló ellenálló képességet meghatározó metilációs mintázatok, a ténylegesen gazdaságilag hasznos fenotípus stabilan tartásához a kezelést egy két generációt követően ismételni szükséges.

A transzgenerációs epigenetikai átvitel egyik generációról a másikra, csak akkor megkérdőjelezhetetlen, ha a hatást az F3 generációban vagy azon túl észlelik (Skinner 2011). Emlősökben endokrinológiai jelátviteli útvonalak tanulmányozása során igazolták, hogy a szülői generáción alkalmazott kezelések hatása az F3 generáció egyedeiben is kimutatható (Anway *et al.* 2005; Burdge *et al.* 2011; Wolstenholme *et al.* 2012).

Más tanulmányok szerint az epigenetikai mintázat generációk közötti átvitele az ivarsejteken keresztül történik. A primordiális csírasejtek azok a sejtek, amelyekből az ivarsejtek alakulnak ki, amik az F2 generációt hozzák létre. Amennyiben a hőkezelés hatására a primordiális csírasejtekben létrejött epigenetikai változások átadódnak az F1 generációra, és ezek az epigenetikai változások stabilan megmaradnak a PGC-kben, a következő két nemzedékre is átadódhatnak. Leírták, hogyha a környezeti hatásnak az első generáció anyai vonala volt kitéve akkor a hatás az F3 nemzedékben is kimutatható, míg az apai vonal kezelése esetén az epigenetikai változás az F2 generációig volt észlelhető (Holliday 2006).

Ezenkívül kimutatták, hogy a miRNS-ek is részt vesznek az epigenetikai információk ivarsejteken keresztüli átvitelében (Marczylo *et al.* 2012).

Kutatásom során a PG-sejttenyészeteket, mint modell rendszert alkalmaztam, amellyel meghatározhatóak a hőkezelés hatására végbemenő molekuláris folyamatokat az utód generációban. A PG-sejttenyészetek tenyészetbe vételét és fenntartását a génbank bővítése mellett ezen biotechnológiai vizsgálatokra is felhasználtam. Modellrendszerként való alkalmazása lehetőséget nyújtott számos molekuláris folyamat vizsgálatára, mint például az epigenetikai módosulások feltárása, amely a szülői generációt ért kezelések hatására ment végbe.

Mindent összevetve a hőkondicionálás és hőstressz az ősvarsejtekben is kimutatható génexpressziós szintváltozásokat idéz elő, ami arra utal, hogy a kezelés okozta epigenetikai változások az utód generációkra átadódnak. Tehát a kutatócsoportunk által alkalmazott kísérleti paraméterek mellett is ki tudtam mutatni a

hőstressz során szerepet játszó faktorok expressziós szintváltozását az utód generációban is, ami alátámasztja az állatok adaptációs képességének öröklődését.

A kutatásunk eredménye gazdaságilag is hasznosítható házityúk esetében. A hőkezelési rendszer gyakorlati alkalmazhatósága elérhető, ugyanis az általunk használt hőkezelési protokoll nem igényel nagyobb összegű beruházást, nem kell alkalmazni táplálékkiegészítőket és vakcinákat, amelyek felhalmozódhatnak a húsban és tojásban. A gazdasági igényeket kiszolgáló telepeken ipari méretű keltető gépeket használnak, így a hőkezelés kivitelezése lehetséges ezekben a gépekben, azáltal, hogy a kikelt csibéket két napos korukban visszahelyezzük, 12 órára 38°C-ra 60%-os páratartalom mellett, biztosítva az ivóvizet és táplálékot. A hőkezelést követően lehetne folytatni a normál csibenevelési protokollt.

Ha a hőkezelési protokoll más házityúk fajták, illetve más baromfi fajok esetében is alkalmazható lenne, biztosítva lenne az, hogy eredményeink széles körben is hozzájárulhassanak a gazdasági termelés hatékonyságának növeléséhez. Tehát közvetlen segítheti a hőkondicionált állatok adaptációs képességét, növekedési paraméterekre, és a tojástermelésre nézve.

Továbbiakban, hogy az állatkísérletekben felhasznált állatok számát csökkenteni lehessen, egy *in vitro* hőkezelési eljárás kidolgozását tervezzük a PGC tenyészeteken végezve a hőkezelést. Ennek segítségével, a hőkezelés hatására a molekuláris jelátviteli útvonalakban létrejövő változások állatkísérlet nélkül is tanulmányozhatók lehetnek.

További terveim között szerepel az RNS szekvenálással kapott szekvenciák egyezésének vizsgálata az adatbázisokban lévő elérhető referencia genommal, amelyet HPC (High Performance Computing) erőforrás felhasználásával szeretnék elvégezni. Mivel a referenciagenom nem az általunk elvégzett kezelési kísérletből származik, ezért a szekvenciák között lehetnek eltérések, így az egyezést úgy kell meghatározni, hogy minimális eltérés elfogadott legyen. Nem lehet merev egyezést vizsgálni, helyette lágy egyezést kell alkalmazni, viszont a lágy egyezés vizsgálat számítási igénye nagyobb. A házityúk teljes genom szekvencia 20.000-23.000 génből áll, ami 1 milliárd DNS bázispár (Furlong 2005). A teljes DNS szekvencia átlapolt szétvágással, a számítási feladat független részekre választható szét és így könnyen párhuzamosítható, ezáltal SMP, GPGPU architektúrán jól skálázható. A feldolgozáshoz HPC környezetben párhuzamosan futtatott Python szoftvert alkalmaznánk, amihez a pyPaSWAS, pyOpenCl, pyCUDA, numpy, biopython

környtárakat tervezek használni (Warris *et al.* 2018) a hozzáférhető HPC adottságaihoz igazítva.

7. Új tudományos eredmények

1. Igazoltam, hogy az előzetes hőkondicionálás hatással van több hőstresszel kapcsolt gén kifejeződésére házityúk agyszövet mintákban. A *HSP70* és *HSP90* expresszió minden csoportban emelkedett a hőkondicionálás hatására, míg a *HSF2* és *HSF3* expressziója ivarérett korban csökkent, amit a hőkondicionálás mérsékelte. A *HSF1* és *HSF4* expressziója nő a kezelés hatására minden csoportban. A *HSF1* expressziója szignifikáns emelkedést mutatott ivarérett korban, a hímivarú egyedekben, a hőkezelés hatására.
2. Kimutattam a miR-138-5P expresszió szignifikáns csökkenését az ivarérett hímivarú egyedek agyszövetében, ezzel igazolva a 2 napos kori hőkondicionálás hosszú távú hatását.
3. Bizonyítottam a miR-302b-3P és miR-302b-5P szerepét a primordiális ivarsejtek (PGC) proliferációjának szabályozásában, ezen miRNS-ek inhibitorainak külön-külön, illetve együttes alkalmazásával. A miR-302-5P expressziójának csökkenésével párhuzamosan csökkent a sejtek proliferációs rátája mind a ZW, mind a ZZ genotípusú PGC-k esetében.
4. A PGC tenyészeteket, mint modell rendszert alkalmaztam a hőkezelés és hőstressz kapcsolt markerek kimutatására. Igazoltam, hogy a miR-92-3P expressziója női ivarban hőstressz hatására nő, míg hímivarban a hőkondicionált és előkezelést nem kapott csoportokban is emelkedett hőstressz esetén. A miR-138-5P expressziója a hőkondicionált és hőstresszelt állatok utód generációjából alapított PGC tenyészetekben volt magasabb mindkét nemből.
5. A PGC tenyészetek esetében igazoltam, hogy az általunk alkalmazott hőkondicionálást követően a *DMRT1*, *RUNX2*, miR-6545 expressziós szintje szignifikánsan megemelkedett.
6. Igazoltam, hogy a hőkezelt házityúkok embrióiból létrehozott PGC tenyészetek esetében a *DMRT1* gén promóter régiójának metilációs szintje csökkent, a kontroll tenyészetekben mérthez képest. A metilációs szint csökkenés következtében a *DMRT1* expressziója megnőtt, amit a qPCR, illetve az RNS szekvenálás eredményei is alátámasztottak. Ezzel igazoltam, hogy az ivarsejtekben a hőkezelés hatására létrejött epigenetikai változás hatása az utód generációban is kimutatható.

8. Összefoglalás

A baromfitenyésztésnek világviszonylatban is nagy jelentősége van, évről évre növekszik a baromfihús fogyasztás. Ennek a megnövekedett igényeknek a kielégítése nem egyszerű, mivel a globális klímaváltozás következtében megemelkedett átlaghőmérséklet negatív hatással van a termelés hatékonyságának emelésére. A hőstressz minden szaporodásbiológiai, növekedési és termelési paramétert negatívan befolyásol. Lehetőség van a tartástechnológia fejlesztésére, akár a takarmányozás, akár az elhelyezés tekintetében, azonban ezek az alternatívák végesek. Szükségessé vált az állatállomány alkalmazkodó képességének segítése és javítása. Az ipari körülmények között zajló termelés a háziasítástól eljutott az egy-egy adott tulajdonságra célzottan történő tenyésztésig. Azonban ez számos értékes genetikai információ elvesztéshez vezetett, ami értékes fajták eltűnését eredményezte.

A technológia- és kutatásfejlesztés előrehaladtával elérhetővé vált genetikai vizsgálatok végzése. Olyan információk tárultak fel, amelyek célzottan képesek támogatni a baromfik adaptációs képességének javítását az által, hogy fel tudtuk térképezni a háttérben zajló molekuláris útvonalakat, valamint házityúk esetében megvalósíthatóvá vált a genetikai anyag hosszú idejű megőrzése a primordiális ősvarsejt tenyészetek létrehozásával. Ezen két problémakörre adhat megoldását a PGC tenyészetek alkalmazása a kutatásokban, lehetőség nyílt hőtűrő fajták előállítására és megőrzésére.

A házityúk adaptációs képessége hőkondicionálással javítható, amit molekuláris biológiai vizsgálatokkal nyert adatokkal is alá tudunk támasztani. Lehetőség van közvetlenül a kezeléseken átesett állomány tanulmányozására, azok szöveteiből kinyert DNS és RNS alapú tesztek elvégzésével, valamint ezen állatok utód generációjából alapított PGC-k DNS és RNS mintáinak vizsgálatára is.

Kutatásaim során elvégeztem a hőkondicionálási kísérletből származó házityúk agyszöveti minták elemzését. Szakirodalomban leírt hőstressz kapcsolt markerek expresszióját térképeztem fel a kutatócsoportunk által beállított kísérleti paraméterek mellett. Eredményeim alapján az általunk alkalmazott hőkondicionálás minden marker esetében emelkedést mutatott a kontrollhoz képest, ami ivarérett korban a *HSF1* és miR-138-5P esetében szignifikáns volt.

Továbbiakban megkezdtem a hőkezelt és hőstresszelt házityúkok utód generációjából alapított PGC-k karakterizálását, amely segíti a genetikai anyag megőrzéséhez szükséges génbank létrehozását. Ezt követően pedig ezen PGC-

tenyészeteket, mint modell rendszert alkalmaztam a hőstresszel kapcsolt markerek vizsgálatára. Eredményeim segíthetik a PGC-tenyésztés és hosszútávú tárolásának optimalizálását. Míg az RNS szekvenálással, DNS metilációs mintázat elemzéssel és qPCR tesztekkel kapott adatok kiértékelésével és szakirodalommal való ok-okozati összefüggések meghatározásával járulhatok hozzá az adaptációs képességet eredményező jelátviteli útvonalak feltárásához. Kimutattam, hogy a miR-92-3P expressziójára is hatással van a hőstressz, ami igazolja a folyamatban való jelenlétét. A miR-138-5P expressziója összhangban van a szöveti mintákban kapott eredményekkel. Mindkét miRNS-nek target helye van a *RUNX2* génen, amelyről már beigazolódott, hogy szerepe van a hőstressz indukálta útvonalakban, illetve az RNS szekvenálás során az általam vizsgált PGC RNS-ekben is kimutatható expressziós szintkülönbség jellemzi. Igazoltam a *DMRT1* gén részvételét a hőstressz indukálta jelátviteli útvonalakban, ezen gén esetében is kimutattam expressziós szint változást hőkezelést követően. Korábbi adatok szerint pedig a miR-138-5P és miR6545 targetálja a *DMRT1*-et, amelyek expressziós szint változása is beigazolódott az RNS szekvenálás és qPCR vizsgálatok során.

Munkám során nyert információkkal (akár közvetlenül a kezelt állatokból, akár közvetve az utód generációból) megerősítettem a házityúk esetében alkalmazható hőkondicionálás hatásosságát, amelynek időzítése fiatal korban a legoptimálisabb. Eredményeim segíthetik a gazdasági termelés hatékony működését klímaváltozás idejében, illetve a hazai házityúk génbank bővítését.

9. Summary

The importance of poultry farming can also be measured in global terms, which shows an increasing trend every year. Economic production meeting the increased global consumption of poultry meat is becoming more and more difficult due to the increased environmental temperature generated by global warming. Heat stress negatively affects all reproductive, growth and production parameters. It is possible to improve husbandry technology, either in terms of feeding or housing, but these alternatives are finite. It has become necessary to help and improve the adaptability of livestock. Production under industrial conditions has progressed from domestication to targeted breeding for specific traits. However, this contributed to the loss of valuable genetic material, which led to the disappearance of breeds.

As technology and research progressed, it became possible to carry out tests at the genetic level. Information was revealed that can support the improvement of the adaptability of poultry by being able to map the molecular pathways taking place in the background, and in the case of domestic fowls, the long-term preservation of genetic material can be achieved with the existence of primordial germ cell cultures. The use of PGC cultures in research can solve these two problems. Therefore, creating varieties resistant to heat stress while preserving genetic material.

The adaptability of domestic hens can be improved by heat conditioning, which we can also support with data obtained from molecular biological tests. It is possible to directly study the flock that has undergone the treatments, by carrying out tests based on DNA and RNA extracted from their tissues, as well as to examine the DNA and RNA samples of PGCs established from the offspring of these animals.

During my research, I analyzed the brain tissue samples of domestic hens from the heat conditioning experiment. It maps the expression of heat stress linked markers described in the literature in addition to the experimental parameters set by our research group. Based on my results, the heat conditioning we used showed an increase for all markers compared to the control, which was significant for *HSF1* and miR-138-5P at puberty.

Furthermore, I started the characterization of PGCs established from the offspring generation of heat-treated and heat-stressed domestic chickens, which helps to create the gene bank necessary for the preservation of genetic material. After that, I used these PGC cultures as a model system for the examination of heat stress-related markers. My results can help to optimize the cultivation and long-term storage of PGC.

While by evaluating the data obtained by RNA sequencing, DNA methylation pattern analysis and qPCR tests and by determining the cause and effect relationships with the literature, I can contribute to the discovery of the signalling pathways resulting in the ability to adapt. I showed that the expression of miR-92-3P is also affected by heat stress, which confirms its presence in the process. The expression of miR-138-5P is consistent with the results obtained in tissue samples. Both miRNAs have a target site on the *RUNX2* gene, which has already been confirmed to play a role in pathways induced by heat stress and is characterized by the difference in expression levels that can also be detected in the PGC RNAs I examined during RNA sequencing. I also confirmed the participation of the *DMRT1* gene, and I also showed a change in the expression level of this gene after treatment. According to previous data, miR-138-5P and miR6545 target *DMRT1*, whose expression level changes were also confirmed during RNA sequencing and qPCR tests.

With the information obtained during my work (either directly from the treated animals or indirectly from the next generation), I confirmed the effectiveness of heat conditioning for domestic hens, the timing of which is most optimal at a young age. My results can help the efficient operation of economic production in times of climate change, as well as the expansion of the gene bank of domestic chickens.

10. Mellékletek

M1. Irodalomjegyzék

- Aengwanich, W. (2008) 'Pathological changes and the effects of ascorbic acid on lesion scores of bursa of Fabricius in broilers under chronic heat stress. ', *Res. J. Vet. Sci.*, (1), 62–66.
- Alexandratos, N. and Bruinsma, J. (2012) *World Agriculture towards 2030/2050: The 2012 Revision*, WORLD AGRICULTURE, available: www.fao.org/economic/esa.
- Anand, M., Tóth, R., Kidane, A., Nagy, A., Lázár, B., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., and Gócza, E. (2016) 'Examination the Expression Pattern of HSP70 Heat Shock Protein in Chicken PGCs and Developing Genital Ridge', *Lucrari stiintifice zootehnie si biotehnologii / Scientific papers animal science and biotechnologies*, (49), 78–82.
- Anway, M.D., Cupp, A.S., Uzumcu, M., and Skinner, M.K. (2005) 'Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility', *Science*, 308(5727), 1466–1469, available: <https://doi.org/10.1126/science.1108190>.
- Babinszky, L., Halas, V., and W.A., M. (2011) 'Impacts of Climate Change on Animal Production and Quality of Animal Food Products', in *Climate Change - Socioeconomic Effects*, InTech, available: <https://doi.org/10.5772/23840>.
- Bakthisaran, R., Tangirala, R., and Rao, Ch.M. (2015) 'Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854(4), 291–319, available: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.12.019>.
- Barna, J., Liptói, K., and Patakiné Várkonyi, E. (2016) 'Mentsük a menthetőt – új lehetőségek baromfifélék in vitro génmegőrzésének terén.', *Magyar Állatorvosok Lapja*, 9(138), 621–630.
- Benton, C.E., Balnave, D., Brake, J., Boyd, L.J., and Brown, M.A. (1998) 'The Use of Dietary Minerals During Heat Stress in Broilers', *The Professional Animal Scientist*, 14(4), 193–196, available: [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31828-3](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31828-3).
- Berne, R.M. and Levy, M.N. (1998) *Fisiologia*, 4th. ed. ed, Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil.

- Borges, S.A., Fischer da Silva, A.V., Majorca, A., Hooge, D.M., and Cummings, K.R. (2004) 'Physiological responses of broiler chickens to heat stress and dietary electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride, milliequivalents per kilogram)', *Poultry Science*, 83(9), 1551–1558, available: <https://doi.org/10.1093/ps/83.9.1551>.
- Bouret, S. and Simerly, R. (2006) 'Developmental programming of hypothalamic feeding circuits', *Clinical Genetics*, 70(4), 295–301, available: <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2006.00684.x>.
- Brocchieri, L., Conway de Macario, E., and Macario, A.J. (2008) 'hsp70 genes in the human genome: Conservation and differentiation patterns predict a wide array of overlapping and specialized functions', *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 19, available: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-19>.
- Brown, K.I. (1959) '“Stress” and its implication in poultry production.', *World's Poult. Sci. J.*, (15), 255–263.
- Burdge, G.C., Hoile, S.P., Uller, T., Thomas, N.A., Gluckman, P.D., Hanson, M.A., and Lillycrop, K.A. (2011) 'Progressive, Transgenerational Changes in Offspring Phenotype and Epigenotype following Nutritional Transition', *PLoS ONE*, 6(11), e28282, available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028282>.
- Cahaner, A., Ajuh, J.A., Siegmund-Schultze, M., Azoulay, Y., Druyan, S., and Zárate, A.V. (2008) 'Effects of the Genetically Reduced Feather Coverage in Naked Neck and Featherless Broilers on Their Performance Under Hot Conditions', *Poultry Science*, 87(12), 2517–2527, available: <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00284>.
- Cahaner, A., Deeb, N., and Gutman, M. (1992) 'Improving broiler growth at high temperatures by the naked neck gene.', in *Proceedings of the 19th World's Poultry Congress*, Amsterdam, the Netherlands, 57–60.
- Cahaner, A., Deeb, N., and Gutman, M. (1993) 'Effects of the Plumage-Reducing Naked Neck (A/a) Gene on the Performance of Fast-Growing Broilers at Normal and High Ambient Temperatures', *Poultry Science*, (72), 767–775.
- Cahaner, A., Deeb, N., and Settar, P. (1996) 'The association between broiler potential growth rate and sensitivity to heat stress', *45th Annual National Breeders Roundtable Proceedings, St. Loise, Missouri, USA*, 2941, 1952–2003.
- Cai, D., He, K., Chang, S., Tong, D., and Huang, C. (2015) 'MicroRNA-302b Enhances the Sensitivity of Hepatocellular Carcinoma Cell Lines to 5-FU via

- Targeting Mcl-1 and DPYD’, *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 23668–23682, available: <https://doi.org/10.3390/ijms161023668>.
- Cataldo, A., Cheung, D.G., Balsari, A., Tagliabue, E., Coppola, V., Iorio, M. V., Palmieri, D., and Croce, C.M. (2016) ‘miR-302b enhances breast cancer cell sensitivity to cisplatin by regulating E2F1 and the cellular DNA damage response’, *Oncotarget*, 7(1), 786–797, available: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6381>.
- Chen, C., Li, H., Xie, Q., Shang, H., Ji, J., Bai, S., Cao, Y., Ma, Y., and Bi, Y. (2011) ‘Transcriptional profiling of host gene expression in chicken liver tissues infected with oncogenic Marek’s disease virus’, *Journal of General Virology*, 92(12), 2724–2733, available: <https://doi.org/10.1099/vir.0.034066-0>.
- Cheng, C.-Y., Tu, W.-L., Wang, S.-H., Tang, P.-C., Chen, C.-F., Chen, H.-H., Lee, Y.-P., Chen, S.-E., and Huang, S.-Y. (2015) ‘Annotation of Differential Gene Expression in Small Yellow Follicles of a Broiler-Type Strain of Taiwan Country Chickens in Response to Acute Heat Stress’, *PLOS ONE*, 10(11), e0143418, available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143418>.
- Coolen, M. and Bally-Cuif, L. (2009) ‘MicroRNAs in brain development and physiology’, *Current Opinion in Neurobiology*, 19(5), 461–470, available: <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.09.006>.
- Cutting, A.D., Bannister, S.C., Doran, T.J., Sinclair, A.H., Tizard, M.V.L., and Smith, C.A. (2012) ‘The potential role of microRNAs in regulating gonadal sex differentiation in the chicken embryo’, *Chromosome Research*, 20(1), 201–213, available: <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9263-y>.
- Daghir, N.J. (2009) ‘Nutritional strategies to reduce heat stress in broilers and broiler breeders.’, *Lohmann Info*, 44(1), 6–15.
- Darnell, D.K., Kaur, S., Stanislaw, S., Konieczka, J.K., Yatskievych, T.A., and Antin, P.B. (2006) ‘MicroRNA expression during chick embryo development’, *Developmental Dynamics*, 235(11), 3156–3165, available: <https://doi.org/10.1002/dvdy.20956>.
- Daswani, R., Gilardi, C., Soutschek, M., Nanda, P., Weiss, K., Bicker, S., Fiore, R., Dieterich, C., Germain, P.-L., Winterer, J., and Schrott, G. (2022) ‘MicroRNA-138 controls hippocampal interneuron function and short-term memory in mice’, *eLife*, 11, available: <https://doi.org/10.7554/eLife.74056>.
- Deans, C. and Maggert, K.A. (2015) ‘What Do You Mean, “Epigenetic”?’, *Genetics*, 199(4), 887–896, available: <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>.

- Deeb, N. and Cahaner, A. (2002) ‘Genotype-by-Environment Interaction with Broiler Genotypes Differing in Growth Rate. 3. Growth Rate and Water Consumption of Broiler Progeny from Weight-Selected Versus Nonselected Parents Under Normal and High Ambient Temperatures’, *Poultry Science*, 81(3), 293–301, available: <https://doi.org/10.1093/ps/81.3.293>.
- Deeb, N., Yunis, R., and Cahaner, A. (1993) ‘Genetic manipulation of feather coverage and its contribution to heat tolerance of commercial broilers.’, in In: Gavora, J.S. and B.J. (eds), ed., *Proceedings of the 10th International Symposium on Current Problems in Avian Genetics*, Nitra, Slovakia, 36–36.
- Deniz Koç, N. and Yüce, R. (2012) ‘A light- and electron microscopic study of primordial germ cells in the zebra fish (*Danio rerio*)’, *Biological Research*, 45(4), 331–336, available: <https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000400001>.
- Dobrinsky, J.R. (2002) ‘Advancements in cryopreservation of domestic animal embryos’, *Theriogenology*, 57(1), 285–302, available: [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00672-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00672-0).
- Donovan, P.J., Stott, D., Godin, I., Heasman, J., and Wylie, C.C. (1987) ‘Studies on the Migration of Mouse Germ Cells’, *Journal of Cell Science*, 1987(Supplement_8), 359–367, available: https://doi.org/10.1242/jcs.1987.Supplement_8.20.
- Dorsch, M., Wedekind, D., Kamino, K., and Hedrich, H.J. (2004) ‘Orthotopic transplantation of rat ovaries as a tool for strain rescue’, *Laboratory Animals*, 38(3), 307–312, available: <https://doi.org/10.1258/002367704323133691>.
- Dunislawska, A., Siwek, M., Stadnicka, K., and Bednarczyk, M. (2021) ‘Comparison of the Transcriptomic and Epigenetic Profiles of Gonadal Primordial Germ Cells of White Leghorn and Green-Legged Partridge-like Chicken Embryos’, *Genes*, 12(7), 1090, available: <https://doi.org/10.3390/genes12071090>.
- Dunnington, E.A. and Siegel, P.B. (1984) ‘Thermoregulation in Newly Hatched Chicks’, *Poultry Science*, 63(7), 1303–1313, available: <https://doi.org/10.3382/ps.0631303>.
- Ecker, A., Lázár, B., Tóth, R.I., Urbán, M., Tokodyné Szabadi, N., Salinas Aponte, M.T., Adnan, M., Várkonyi, E., and Gócza, E. (2023) ‘The Effects of Freezing Media on the Characteristics of Male and Female Chicken Primordial Germ Cell Lines’, *Life*, 13(4), 867, available: <https://doi.org/10.3390/life13040867>.
- Eyal-Giladi, H. and Kochav, S. (1976) ‘From cleavage to primitive streak formation: A complementary normal table and a new look at the first stages of the

- development of the chick', *Developmental Biology*, 49(2), 321–337, available: [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90178-0](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90178-0).
- FAO (2007) Interlaken Declaration on Animal Genetic Resources. Global Plan of Action for Animal Genetic Resources [online], available: <http://www.fao.org/3/a-a1404e.pdf> [accessed 6 Dec 2023].
- FAO Report. (2019) Status And Trends Of Animal Genetic Resources. 17th Session, 2019. Rome. [online], available: <http://www.fao.org/3/my867en/my867en.pdf> [accessed 6 Dec 2023].
- FAOSTAT [online] (2023) available: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> [accessed 8 Jul 2023].
- Fathi, M.M., Galal, A., El-Safty, S., and Mahrous, M. (2013) 'Naked neck and frizzle genes for improving chickens raised under high ambient temperature: I. Growth performance and egg production', *World's Poultry Science Journal*, 69(4), 813–832, available: <https://doi.org/10.1017/S0043933913000834>.
- Felver-Gant, J.N., Mack, L.A., Dennis, R.L., Eicher, S.D., and Cheng, H.W. (2012) 'Genetic variations alter physiological responses following heat stress in 2 strains of laying hens', *Poultry Science*, 91(7), 1542–1551, available: <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01988>.
- Fujimoto, T., Ukeshima, A., and Kiyofuji, R. (1976) 'The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo', *The Anatomical Record*, 185(2), 139–153, available: <https://doi.org/10.1002/ar.1091850203>.
- Furlong, R.F. (2005) 'Insights into vertebrate evolution from the chicken genome sequence', *Genome Biology*, 6(2), 207, available: <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-2-207>.
- Gebert, L.F.R. and MacRae, I.J. (2019) 'Regulation of microRNA function in animals', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), 21–37, available: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>.
- Geudens, K. (2019) The First High Concentration Stable Liquid Vitamin Solution Designed to Combat Heat Stress and Aid Animal Immune System [online], available: https://en.engormix.com/poultry-industry/vitamins-poultry-nutrition/the-first-high-concentration_n25400/ [accessed 29 Feb 2024].
- Ghazi, Sh., Habibian, M., Moeini, M.M., and Abdolmohammadi, A.R. (2012) 'Effects of Different Levels of Organic and Inorganic Chromium on Growth Performance and Immunocompetence of Broilers under Heat Stress', *Biological*

- Trace Element Research*, 146(3), 309–317, available: <https://doi.org/10.1007/s12011-011-9260-1>.
- Hahnel AC and Eddy EM. (1986) ‘Cell surface markers of mouse primordial germ cells defined by two monoclonal antibodies. ’, *Gamete Res.*, (15), 1235–1244.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1992) ‘A series of normal stages in the development of the chick embryo’, *Developmental Dynamics*, 195(4), 231–272, available: <https://doi.org/10.1002/aja.1001950404>.
- Hashemzadeh, M.R. (2017) ‘Role of micro RNAs in stem cells, cardiac differentiation and cardiovascular diseases’, *Gene Reports*, 8, 11–16, available: <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2017.04.012>.
- Hay, B., Jan, L.Y., and Jan, Y.N. (1988) ‘A protein component of Drosophila polar granules is encoded by vasa and has extensive sequence similarity to ATP-dependent helicases’, *Cell*, 55(4), 577–587, available: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(88\)90216-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(88)90216-4).
- He, L. and Hannon, G.J. (2004) ‘MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation’, *Nature Reviews Genetics*, 5(7), 522–531, available: <https://doi.org/10.1038/nrg1379>.
- Hillier, L.A.W. (2004) ‘Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution’, *Nature*, 432(7018), 695–716, available: <https://doi.org/10.1038/nature03154>.
- Holliday, R. (2006) ‘Epigenetics: A Historical Overview’, *Epigenetics*, 1(2), 76–80, available: <https://doi.org/10.4161/epi.1.2.2762>.
- Horn, P. (2008) ‘A baromfitenyésztés fejlődésének kilátásai, új kihívások, veszélyforrások és lehetőségek. ’, *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 12(57), 389–401.
- Hoter, A., El-Sabban, M., and Naim, H. (2018) ‘The HSP90 Family: Structure, Regulation, Function, and Implications in Health and Disease’, *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 2560, available: <https://doi.org/10.3390/ijms19092560>.
- Houbavity, H.B., Dennis, L., Jaenisch, R., and Sharp, P.A. (2005) ‘Characterization of a highly variable eutherian microRNA gene’, *RNA*, 11(8), 1245–1257, available: <https://doi.org/10.1261/rna.2890305>.
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. (2003) ‘Embryonic Stem Cell-Specific MicroRNAs’, *Developmental Cell*, 5(2), 351–358, available: [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00227-2](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00227-2).

- Hy-Line International (2016)
https://www.hyline.com/userdocs/pages/tu_heat_eng.pdf [online].
- Inouye, S., Izu, H., Takaki, E., Suzuki, H., Shirai, M., Yokota, Y., Ichikawa, H., Fujimoto, M., and Nakai, A. (2004) 'Impaired IgG Production in Mice Deficient for Heat Shock Transcription Factor 1', *Journal of Biological Chemistry*, 279(37), 38701–38709, available: <https://doi.org/10.1074/jbc.M405986200>.
- IPCC (2007) Climate Change 2007: Impacts, Adaptation and Vulnerability. Summary for Policy Makers. [online], 2007, available: <http://www.ipcc.cg/SPM13apr07.pdf> [accessed 6 Dec 2023].
- Ishii, Y. and Bouret, S.G. (2012) 'Embryonic Birthdate of Hypothalamic Leptin-Activated Neurons in Mice', *Endocrinology*, 153(8), 3657–3667, available: <https://doi.org/10.1210/en.2012-1328>.
- Johnson, J.L. (2012) 'Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins', *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(3), 607–613, available: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.020>.
- Kagami, H. (2016) 'Perspectives on avian stem cells for poultry breeding', *Animal Science Journal*, 87(9), 1065–1075, available: <https://doi.org/10.1111/asj.12620>.
- Kampinga, H.H. and Craig, E.A. (2010) 'The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 11(8), 579–592, available: <https://doi.org/10.1038/nrm2941>.
- Khodayari, N., Mohammed a, K., Lee, H., KayeFrederick, and Nasreen, N. (2016) 'MicroRNA-302b targets Mcl-1 and inhibits cell proliferation and induces apoptosis in malignant pleural mesothelioma cells', *Am J Cancer Res*, 9(6), 1996–2009.
- Kisliouk, T., Cramer, T., and Meiri, N. (2014) 'Heat stress attenuates new cell generation in the hypothalamus: A role for miR-138', *Neuroscience*, 277, 624–636, available: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.047>.
- Kisliouk, T., Cramer, T., and Meiri, N. (2017) 'Methyl CpG level at distal part of heat-shock protein promoter HSP70 exhibits epigenetic memory for heat stress by modulating recruitment of POU2F1-associated nucleosome-remodeling deacetylase (NuRD) complex', *Journal of Neurochemistry*, 141(3), 358–372, available: <https://doi.org/10.1111/jnc.14014>.

- Kisliouk, T. and Meiri, N. (2013) 'MiR-138 promotes the migration of cultured chicken embryonic hypothalamic cells by targeting reelin', *Neuroscience*, 238, 114–124, available: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2013.02.020>.
- Kisliouk, T., Yosefi, S., and Meiri, N. (2011) 'MiR-138 inhibits EZH2 methyltransferase expression and methylation of histone H3 at lysine 27, and affects thermotolerance acquisition', *European Journal of Neuroscience*, 33(2), 224–235, available: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07493.x>.
- Komiya, T. and Tanigawa, Y. (1995) 'Cloning of a Gene of the Dead Box Protein Family Which Is Specifically Expressed in Germ Cells in Rats', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 207(1), 405–410, available: <https://doi.org/10.1006/bbrc.1995.1202>.
- Köprunner, M., Thisse, C., Thisse, B., and Raz, E. (2001) 'A zebrafish *nanos* -related gene is essential for the development of primordial germ cells', *Genes & Development*, 15(21), 2877–2885, available: <https://doi.org/10.1101/gad.212401>.
- Kőrösiné M. A., Nógrádi J., Varga S., Podmaniczky B., Gerendai D., and Szabó Zs. (2005) 'Madarak hőtüro-képességének javítása és a hőstressz csökkentésének lehetőségei a baromfitartásban', *AGRO-21 füzetek*.
- Lara, L. and Rostagno, M. (2013) 'Impact of Heat Stress on Poultry Production', *Animals*, 3(2), 356–369, available: <https://doi.org/10.3390/ani3020356>.
- Lawal, R.A. and Hanotte, O. (2021) 'Domestic chicken diversity: Origin, distribution, and adaptation', *Animal Genetics*, 52(4), 385–394, available: <https://doi.org/10.1111/age.13091>.
- Lázár, B., Anand, M., Tóth, R., Várkonyi, E.P., Liptói, K., and Gócza, E. (2018) 'Comparison of the MicroRNA Expression Profiles of Male and Female Avian Primordial Germ Cell Lines', *Stem Cells International*, 2018, 1–17, available: <https://doi.org/10.1155/2018/1780679>.
- Lázár, B., Molnár, M., Sztán, N., Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Tokodyné Szabadi, N., McGrew, M.J., Gócza, E., and Patakiné Várkonyi, E. (2021) 'Successful cryopreservation and regeneration of a partridge colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells', *Poultry Science*, 100(8), 101207, available: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101207>.
- Lázár, B., Szabadi, N.T., Anand, M., Tóth, R., Ecker, A., Urbán, M., Aponte, M.T.S., Stepanova, G., Hegyi, Z., Homolya, L., Várkonyi, E.P., Pain, B., and Gócza, E. (2021) 'Effect of miR-302b MicroRNA Inhibition on Chicken Primordial Germ

- Cell Proliferation and Apoptosis Rate’, *Genes*, 13(1), 82, available: <https://doi.org/10.3390/genes13010082>.
- Lee, S.I., Lee, B.R., Hwang, Y.S., Lee, H.C., Rengaraj, D., Song, G., Park, T.S., and Han, J.Y. (2011) ‘MicroRNA-mediated posttranscriptional regulation is required for maintaining undifferentiated properties of blastoderm and primordial germ cells in chickens’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(26), 10426–10431, available: <https://doi.org/10.1073/pnas.1106141108>.
- Leinonen, I., Williams, A.G., and Kyriazakis, I. (2014) ‘The effects of welfare-enhancing system changes on the environmental impacts of broiler and egg production’, *Poultry Science*, 93(2), 256–266, available: <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03252>.
- Li, C., Guo, S., Zhang, M., Gao, J., and Guo, Y. (2015) ‘DNA methylation and histone modification patterns during the late embryonic and early postnatal development of chickens’, *Poultry Science*, 94(4), 706–721, available: <https://doi.org/10.3382/ps/pev016>.
- Li, G.C. and Mak, J.Y. (2009) ‘Re-induction of hsp70 synthesis: An assay for thermotolerance’, *International Journal of Hyperthermia*, 25(4), 249–257, available: <https://doi.org/10.1080/02656730902924948>.
- Lin, H., Jiao, H.C., Buyse, J., and Decuyper, E. (2006) ‘Strategies for preventing heat stress in poultry’, *World’s Poultry Science Journal*, 62(1), 71–86, available: <https://doi.org/10.1079/WPS200585>.
- Liptoi, K., Buda, K., Rohn, E., Drobnay, A., Meleg, E.E., Palinkas-Bodzsar, N., Vegi, B., and Barna, J. (2020) ‘Improvement of the application of gonadal tissue allotransplantation in the in vitro conservation of chicken genetic lines’, *Animal Reproduction Science*, 213, 106280, available: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2020.106280>.
- Liptoi, K., Horvath, G., Gal, J., Varadi, E., and Barna, J. (2013) ‘Preliminary results of the application of gonadal tissue transfer in various chicken breeds in the poultry gene conservation’, *Animal Reproduction Science*, 141(1–2), 86–89, available: <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.06.016>.
- Liptói, K., Szabó, Zs., Podmaniczky, B., and Körösiné Molnár, A. (2010) ‘Preliminary investigation of the effect of heat treatment on fertility and embryonic mortality in goose. ’, *Worlds Poult Sci J.*, (66), 513–513.
- Loyau, T., Hennequet-Antier, C., Coustham, V., Berri, C., Leduc, M., Crochet, S., Sannier, M., Duclos, M.J., Mignon-Grasteau, S., Tesseraud, S., Brionne, A.,

- Métayer-Coustard, S., Moroldo, M., Lecardonnel, J., Martin, P., Lagarrigue, S., Yahav, S., and Collin, A. (2016) 'Thermal manipulation of the chicken embryo triggers differential gene expression in response to a later heat challenge', *BMC Genomics*, 17(1), 329, available: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2661-y>.
- Maes, O., Chertkow, H., Wang, E., and Schipper, H. (2009) 'MicroRNA: Implications for Alzheimer Disease and other Human CNS Disorders', *Current Genomics*, 10(3), 154–168, available: <https://doi.org/10.2174/138920209788185252>.
- De Maio, A. and Vazquez, D. (2013) 'Extracellular Heat Shock Proteins', *Shock*, 40(4), 239–246, available: <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e3182a185ab>.
- Maraghechi, P., Aponte, M.T.S., Ecker, A., Lázár, B., Tóth, R., Szabadi, N.T., and Gócza, E. (2023) 'Pluripotency-Associated microRNAs in Early Vertebrate Embryos and Stem Cells', *Genes*, 14(7), 1434, available: <https://doi.org/10.3390/genes14071434>.
- Marczylo, E.L., Amoako, A.A., Konje, J.C., Gant, T.W., and Marczylo, T.H. (2012) 'Smoking induces differential miRNA expression in human spermatozoa: A potential transgenerational epigenetic concern?', *Epigenetics*, 7(5), 432–439, available: <https://doi.org/10.4161/epi.19794>.
- Martino, S., di Girolamo, I., Orlacchio, A., Datti, A., and Orlacchio, A. (2009) 'MicroRNA Implications across Neurodevelopment and Neuropathology', *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009, 1–13, available: <https://doi.org/10.1155/2009/654346>.
- De Melo Bernardo, A., Sprenkels, K., Rodrigues, G., Noce, T., and Chuva De Sousa Lopes, S.M. (2012) 'Chicken primordial germ cells use the anterior vitelline veins to enter the embryonic circulation', *Biology Open*, 1(11), 1146–1152, available: <https://doi.org/10.1242/bio.20122592>.
- Murugesan, S., Ullengala, R., and Amirthalingam, V. (2017) 'Heat Shock Protein and Thermal Stress in Chicken', 179–193, available: https://doi.org/10.1007/978-3-319-73377-7_6.
- Nagai, T., Yamaha, E., and Arai, K. (2001) 'Histological Differentiation of Primordial Germ Cells in Zebrafish', *Zoological Science*, 18(2), 215–223, available: <https://doi.org/10.2108/zsj.18.215>.
- Nakai, A. and Morimoto, R.I. (1993) 'Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway.',

- Molecular and Cellular Biology*, 13(4), 1983–1997, available: <https://doi.org/10.1128/MCB.13.4.1983>.
- Nawab, A., Ibtisham, F., Li, G., Kieser, B., Wu, J., Liu, W., Zhao, Y., Nawab, Y., Li, K., Xiao, M., and An, L. (2018) ‘Heat stress in poultry production: Mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry’, *Journal of Thermal Biology*, 78, 131–139, available: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.010>.
- Nieuwkoop, P.D. and Sutasurya, L.A. (1979) *Primordial Germ Cells in the Chordates : Embryogenesis and Phylogenesis. Developmental and Cell Biology Series 7*, Cambridge University Press.
- OECD-FAO *Agricultural Outlook 2020-2029* (2020) OECD, available: <https://doi.org/10.1787/1112c23b-en>.
- Park, W., Srikanth, K., Lim, D., Park, M., Hur, T., Kemp, S., Dessie, T., Kim, M.S., Lee, S. -R., te Pas, M.F.W., Kim, J. -M., and Park, J. -E. (2019) ‘Comparative transcriptome analysis of Ethiopian indigenous chickens from low and high altitudes under heat stress condition reveals differential immune response’, *Animal Genetics*, 50(1), 42–53, available: <https://doi.org/10.1111/age.12740>.
- Patakiné Várkonyi, E., Horváth, G., Sztán, N., VÁradi, É., and Barna, J. (2012) ‘Vitrification of early avian blastodermal cells with a new type of cryocontainer’, *Acta Veterinaria Hungarica*, 60(4), 501–509, available: <https://doi.org/10.1556/avet.2012.044>.
- Perini, F., Cendron, F., Rovelli, G., Castellini, C., Cassandro, M., and Lasagna, E. (2020) ‘Emerging Genetic Tools to Investigate Molecular Pathways Related to Heat Stress in Chickens: A Review’, *Animals*, 11(1), 46, available: <https://doi.org/10.3390/ani11010046>.
- Picon-Ruiz, M., Pan, C., Drews-Elger, K., Jang, K., Besser, A.H., Zhao, D., Morata-Tarifa, C., Kim, M., Ince, T.A., Azzam, D.J., Wander, S.A., Wang, B., Ergonul, B., Datar, R.H., Cote, R.J., Howard, G.A., El-Ashry, D., Torné-Poyatos, P., Marchal, J.A., and Slingerland, J.M. (2016) ‘Interactions between Adipocytes and Breast Cancer Cells Stimulate Cytokine Production and Drive Src/Sox2/miR-302b–Mediated Malignant Progression’, *Cancer Research*, 76(2), 491–504, available: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0927>.
- Prastowo, S. and Ratriyanto, A. (2021) ‘miRNA target prediction of avian Z-linked DMRT1 gene during sex determination in chicken (*G. Gallus*)’, *IOP Conference*

- Series: Earth and Environmental Science*, 905(1), 012148, available: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/905/1/012148>.
- Rajkumar, U., Reddy, M.R., Rao, S.V.R., Radhika, K., and Shanmugam, M. (2011) 'Evaluation of Growth, Carcass, Immune Response and Stress Parameters in Naked Neck Chicken and Their Normal Siblings under Tropical Winter and Summer Temperatures', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(4), 509–516, available: <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10312>.
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., and Lin, X. (n.d.) *An Improvement of the 2^{-Delta-Delta CT} Method for Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Data Analysis*.
- Raz, E. (2000) 'The function and regulation of vasa-like genes in germ-cell development', *Genome Biology*, 1(3), reviews1017.1, available: <https://doi.org/10.1186/gb-2000-1-3-reviews1017>.
- Rojas-Downing, M.M., Nejadhashemi, A.P., Harrigan, T., and Woznicki, S.A. (2017) 'Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation', *Climate Risk Management*, 16, 145–163, available: <https://doi.org/10.1016/j.crm.2017.02.001>.
- Ruíz-López, B. and Austic, R.E. (1993) 'The Effect of Selected Minerals on the Acid-Base Balance of Growing Chicks', *Poultry Science*, 72(6), 1054–1062, available: <https://doi.org/10.3382/ps.0721054>.
- Safdar, M. and Özaslan, M. (2023) 'MicroRNAs as potential biomarkers for heat stress in livestock', *Zeugma Biological Science*, 4, 6–12, available: <https://doi.org/10.55549/zbs.1280878>.
- Sahin, K., Sahin, N., Kucuk, O., Hayirli, A., and Prasad, A.S. (2009) 'Role of dietary zinc in heat-stressed poultry: A review', *Poultry Science*, 88(10), 2176–2183, available: <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00560>.
- Saju, J.M., Hossain, M.S., Liew, W.C., Pradhan, A., Thevasagayam, N.M., Tan, L.S.E., Anand, A., Olsson, P.-E., and Orbán, L. (2018) 'Heat Shock Factor 5 Is Essential for Spermatogenesis in Zebrafish', *Cell Reports*, 25(12), 3252–3261.e4, available: <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.090>.
- Schratt, G. (2009) 'microRNAs at the synapse', *Nature Reviews Neuroscience*, 10(12), 842–849, available: <https://doi.org/10.1038/nrn2763>.
- Shaner, L. and Morano, K.A. (2007) 'All in the family: atypical Hsp70 chaperones are conserved modulators of Hsp70 activity', *Cell Stress & Chaperones*, 12(1), 1, available: <https://doi.org/10.1379/CSC-245R.1>.

- Shevinsky, L.H., Knowles, B.B., Damjanov, I., and Solter, D. (1982) ‘Monoclonal antibody to murine embryos defines a stage-specific embryonic antigen expressed on mouse embryos and human teratocarcinoma cells’, *Cell*, 30(3), 697–705, available: [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(82\)90274-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(82)90274-4).
- Silva, R., Hiemstra S., J., C., L., and C Moran, D. (2023) *The Economics of Gene Banking. Innovations in Cryoconservation of Animal Genetic Resources*, FAO, available: <https://doi.org/10.4060/cc3078en>.
- Skinner, M.K. (2011) ‘Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability’, *Epigenetics*, 6(7), 838–842, available: <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16537>.
- Smith, C.A. and Sinclair, A.H. (2004) ‘Sex determination: insights from the chicken’, *BioEssays*, 26(2), 120–132, available: <https://doi.org/10.1002/bies.10400>.
- Song, Y. and Silversides, F.G. (2006) ‘The Technique of Orthotopic Ovarian Transplantation in the Chicken’, *Poultry Science*, 85(6), 1104–1106, available: <https://doi.org/10.1093/ps/85.6.1104>.
- Sonkoly, E. and Pivarcsi, A. (2009) ‘Advances in microRNAs: implications for immunity and inflammatory diseases’, *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 13(1), 24–38, available: <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00534.x>.
- St-Pierre, N.R., Cobanov, B., and Schnitkey, G. (2003) ‘Economic Losses from Heat Stress by US Livestock Industries’, *Journal of Dairy Science*, 86, E52–E77, available: [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(03\)74040-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(03)74040-5).
- Sun, Y., Liu, W.-Z., Liu, T., Feng, X., Yang, N., and Zhou, H.-F. (2015) ‘Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis’, *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35(6), 600–604, available: <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412>.
- Szabó, Zs., Kőrösiné, M.A., Podmaniczky, B., Végi, B., and Horel, K. (2009) ‘A fiatalkori hőkezelés hatása a brojlersirkék teljesítményére és húsminőségére.’, *Állattenyésztés és Takarmányozás*, (58), 173–191.
- Szarek, E., Cheah, P.-S., Schwartz, J., and Thomas, P. (2010) ‘Molecular genetics of the developing neuroendocrine hypothalamus’, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 323(1), 115–123, available: <https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.04.002>.
- Tanabe, M., Nakai, A., Kawazoe, Y., and Nagata, K. (1997) ‘Different Thresholds in the Responses of Two Heat Shock Transcription Factors, HSF1 and HSF3’,

- Journal of Biological Chemistry*, 272(24), 15389–15395, available: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15389>.
- Tavares, A.L.P., Brown, J.A., Ulrich, E.C., Dvorak, K., and Runyan, R.B. (2018) ‘Runx2-I is an Early Regulator of Epithelial–Mesenchymal Cell Transition in the Chick Embryo’, *Developmental Dynamics*, 247(3), 542–554, available: <https://doi.org/10.1002/dvdy.24539>.
- Thornton, P.K. (2010) ‘Livestock production: recent trends, future prospects’, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2853–2867, available: <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0134>.
- Tokodyné Szabadi N., Sima K., Tóth R., Lázár B., Molnár M., Patakiné Várkonyi E., and Gócza E. (2021) ‘Házityúk esetében alkalmazható in vitro génmegőrzés, az ősvarsejt tenyészetek jelentősége’, in Szabó, P., Simon, B., Soós, A., Faludi, G. and Fitos, G., eds., *Kutatás-Fejlesztés-Innováció Az Agrárium Szolgálatában II. Kötet.*, Budapest: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ), 167–180.
- Tokodyné Szabadi, N., Tóth, R., Lázár, B., Ecker, A., Urbán, M., Várkonyi, E., Liptói, K., and Gócza, E. (2024) ‘Hőkondicionálás hatására létrejövő molekuláris változások vizsgálata a házityúkok agyszövetében’, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 146(2), 67–75, available: <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.02.67-80>.
- Tokodyné Szabadi, N., Tóth, R., Lázár, B., Várkonyi, E., Liptói, K., Tokody, D., Ady, L., and Gócza, E. (2023) ‘Klímaváltozás hatása a házityúk reprodukív rendszerére’, *Animal welfare etológia és tartástechnológia / Animal welfare ethology and housing systems*, 19(1), 92–101.
- Tóth, R., Lázár, B., and Gócza, E. (2018) ‘Tyúkok, tojások, őssejtek. A házityúk-ivarszerv kialakulásának érdekességei.’, *Természet világa: természettudományi közlöny*, 11(149), 498–504.
- Tóth, R., Lázár, B., Tokodyné Szabadi, N., Patakiné Várkonyi, E., and Gócza, E. (2019) ‘Őshonos magyar tyúkfajták, mint lehetséges univerzálisrecipiensek az ősvarsejt alapú génmegőrzésben.’, *Magyar Állatorvosok Lapja*, 141, 439–447.
- Tóth, R., Tokodyné Szabadi, N., Lázár, B., Buda, K., Végi, B., Barna, J., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., Pain, B., and Gócza, E. (2021) ‘Effect of Post-Hatch Heat-Treatment in Heat-Stressed Transylvanian Naked Neck Chicken’, *Animals*, 11(6), 1575, available: <https://doi.org/10.3390/ani11061575>.
- Trinklein, N.D., Chen, W.C., Kingston, R.E., and Myers, R.M. (2004) ‘Transcriptional regulation and binding of heat shock factor 1 and heat shock

- factor 2 to 32 human heat shock genes during thermal stress and differentiation’, *Cell Stress & Chaperones*, 9(1), 21–28, available: <https://doi.org/10.1379/481.1>.
- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T., and Noce, T. (2000) ‘Isolation of chicken *vasa* homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells’, *Development*, 127(12), 2741–2750, available: <https://doi.org/10.1242/dev.127.12.2741>.
- Tzschentke, B. (2007) ‘Attainment of Thermoregulation as Affected by Environmental Factors’, *Poultry Science*, 86(5), 1025–1036, available: <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1025>.
- Vajta, G. and Kuwayama, M. (2006) ‘Improving cryopreservation systems’, *Theriogenology*, 65(1), 236–244, available: <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2005.09.026>.
- Varasteh, S., Braber, S., Akbari, P., Garssen, J., and Fink-Gremmels, J. (2015) ‘Differences in Susceptibility to Heat Stress along the Chicken Intestine and the Protective Effects of Galacto-Oligosaccharides’, *PLOS ONE*, 10(9), e0138975, available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138975>.
- Végi, B., Váradi, É., and Barna, J. (2017) ‘Génmegőrzés a hím szaporító anyag hosszú távú tárolásával’, in Szalay István, ed., *Génbanki Kutatások Régi Haszonállataink Védelmében: Műhelytanulmányok a Tudományos Génmegőrzés Tárgyköréből.*, Budapest: Gödöllő: Mezőgazda Kiadó, 46–59.
- Vinoth, A., Thirunalasundari, T., Shanmugam, M., Uthrakumar, A., Suji, S., and Rajkumar, U. (2018) ‘Evaluation of DNA methylation and mRNA expression of heat shock proteins in thermal manipulated chicken’, *Cell Stress and Chaperones*, 23(2), 235–252, available: <https://doi.org/10.1007/s12192-017-0837-2>.
- Wang, M.-S., Thakur, M., Peng, M.-S., Jiang, Y., Frantz, L.A.F., Li, M., Zhang, J.-J., Wang, S., Peters, J., Otecko, N.O., Suwannapoom, C., Guo, X., Zheng, Z.-Q., Esmailzadeh, A., Hirimuthugoda, N.Y., Ashari, H., Suladari, S., Zein, M.S.A., Kusza, S., Sohrabi, S., Kharrati-Koopae, H., Shen, Q.-K., Zeng, L., Yang, M.-M., Wu, Y.-J., Yang, X.-Y., Lu, X.-M., Jia, X.-Z., Nie, Q.-H., Lamont, S.J., Lasagna, E., Ceccobelli, S., Gunwardana, H.G.T.N., Senasige, T.M., Feng, S.-H., Si, J.-F., Zhang, H., Jin, J.-Q., Li, M.-L., Liu, Y.-H., Chen, H.-M., Ma, C., Dai, S.-S., Bhuiyan, A.K.F.H., Khan, M.S., Silva, G.L.L.P., Le, T.-T., Mwai, O.A., Ibrahim, M.N.M., Supple, M., Shapiro, B., Hanotte, O., Zhang, G., Larson, G., Han, J.-L., Wu, D.-D., and Zhang, Y.-P. (2020) ‘863 genomes reveal the origin

- and domestication of chicken', *Cell Research*, 30(8), 693–701, available: <https://doi.org/10.1038/s41422-020-0349-y>.
- Wang, S.-H., Cheng, C.-Y., Tang, P.-C., Chen, C.-F., Chen, H.-H., Lee, Y.-P., and Huang, S.-Y. (2015) 'Acute Heat Stress Induces Differential Gene Expressions in the Testes of a Broiler-Type Strain of Taiwan Country Chickens', *PLOS ONE*, 10(5), e0125816, available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125816>.
- Wang, Y., Xiao, Z., Li, L., Fan, W., and Li, S.-W. (2008) 'Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian tissue cryopreservation', *Human Reproduction*, 23(10), 2256–2265, available: <https://doi.org/10.1093/humrep/den255>.
- Warris, S., Timal, N.R.N., Kempenaar, M., Poortinga, A.M., van de Geest, H., Varbanescu, A.L., and Nap, J.-P. (2018) 'pyPaSWAS: Python-based multi-core CPU and GPU sequence alignment', *PLOS ONE*, 13(1), e0190279, available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190279>.
- West, B. and Zhou, B.-X. (1989) 'Did chickens go north? New evidence for domestication', *World's Poultry Science Journal*, 45(3), 205–218, available: <https://doi.org/10.1079/WPS19890012>.
- Whyte, J., Glover, J.D., Woodcock, M., Brzeszczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., Kaiser, P., and McGrew, M.J. (2015) 'FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal', *Stem Cell Reports*, 5(6), 1171–1182, available: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.008>.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009) 'Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation', *Nature Cell Biology*, 11(3), 228–234, available: <https://doi.org/10.1038/ncb0309-228>.
- Wolfenson, D., Frei, Y.F., Snapir, N., and Berman, A. (1981) 'Heat stress effects on capillary blood flow and its redistribution in the laying hen', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 390(1), 86–93, available: <https://doi.org/10.1007/BF00582717>.
- Wolpert, L., Tickle, C., and Martinez Arias, A. (2019) *Principles of Development*, 6th ed.
- Wolstenholme, J.T., Edwards, M., Shetty, S.R.J., Gatewood, J.D., Taylor, J.A., Rissman, E.F., and Connelly, J.J. (2012) 'Gestational Exposure to Bisphenol A Produces Transgenerational Changes in Behaviors and Gene Expression', *Endocrinology*, 153(8), 3828–3838, available: <https://doi.org/10.1210/en.2012-1195>.

- Wong, G.K.-S. (2004) 'A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms', *Nature*, 432(7018), 717–722, available: <https://doi.org/10.1038/nature03156>.
- Wu, H., Cai, K., Ma, J., Chen, G., Dang, Y., Lu, H., and Pan, S. (2019) 'Evaluation of miR-302b-5p expression and molecular mechanism in hepatocellular carcinoma: Findings based on RT-qPCR and in silico analysis', *Pathology - Research and Practice*, 215(7), 152424, available: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.04.016>.
- Xie, J., Tang, L., Lu, L., Zhang, L., Xi, L., Liu, H.-C., Odle, J., and Luo, X. (2014) 'Differential Expression of Heat Shock Transcription Factors and Heat Shock Proteins after Acute and Chronic Heat Stress in Laying Chickens (*Gallus gallus*)', *PLoS ONE*, 9(7), e102204, available: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102204>.
- Xin, H. and Harmon, J.D. (1998) 'Livestock Industry Facilities and Environment: Heat Stress Indices for Livestock. ', *Agricultural and Food Sciences, Environmental Science*, 163.
- Zhang, W.W., Kong, L.N., Zhang, X.Q., and Luo, Q.B. (2014) 'Alteration of HSF3 and HSP70 mRNA expression in the tissues of two chicken breeds during acute heat stress', *Genetics and Molecular Research*, 13(4), 9787–9794, available: <https://doi.org/10.4238/2014.November.27.6>.

11. Publikációk

11.1. A disszertáció témaköréből megjelent publikációk

- **Tokodyné Szabadi Nikolett**, Tóth Roland, Lázár Bence, Ecker András, Urbán Martin, Várkonyi Eszter, Liptói Krisztina, Gócza Elen (2024). „Hőkondicionálás hatására létrejövő molekuláris változások vizsgálata a házityúkok agyszövetében/ Investigation of molecular changes in the brain tissue of Transylvanian naked neck chicken caused by heat conditioning” Magyar Állatorvosok Lapja, 146 (2), 67-75. [10.56385/magyallorv.2024.02.67-75](https://doi.org/10.56385/magyallorv.2024.02.67-75).
- **Tokodyné Szabadi Nikolett**; Tóth Roland; Lázár Bence; Várkonyi Eszter; Liptói Krisztina; Tokody Dániel; Ady László; Gócza Elen (2023). „Klímaváltozás hatása a házityúk reproduktív rendszerére” Animal welfare etológia és tartástechnológia / Animal welfare ethology and housing systems 19: 1 pp. 92-101., 10 p.
- Bence Lázár*, **Nikolett Tokodyné Szabadi***, Mahek Anand, Roland Tóth, András Ecker, Martin Urbán, Maria Teresa Salinas Aponte, Ganna Stepanova, Zoltán Hegyi, László Homolya, Eszter Patakiné Várkonyi, Bertrand Pain, Elen Gócza (2022). "Effect of miR-302b MicroRNA Inhibition on Chicken Primordial Germ Cell Proliferation and Apoptosis Rate" Genes 13, no. 1: 82. <https://doi.org/10.3390/genes13010082>.
- Roland Tóth, **Nikolett Tokodyné Szabadi**, Bence Lázár, Kitti Buda, Barbara Végi, Judit Barna, Eszter Patakiné Várkonyi, Krisztina Liptói, Bertrand Pain, Elen Gócza (2021). "Effect of Post-Hatch Heat-Treatment in Heat-Stressed Transylvanian Naked Neck Chicken" Animals 11, no. 6: 1575. <https://doi.org/10.3390/ani11061575>.
- **Tokodyné Szabadi Nikolett**; Sima Krisztina; Tóth Roland; Lázár Bence; Patakiné Várkonyi Eszter; Liptói Krisztina; Gócza, Elen (2020). „Hőstressz hatására aktiválódó fiziológiai válaszok házityúkban, a hőháztartás fenntartása érdekében” Állattenyésztés és takarmányozás” 69: 1 pp. 41-52., 12 p.

- Maraghechi Pouneh, Maria Teresa Salinas Aponte, András Ecker, Bence Lázár, Roland Tóth, **Nikolett Tokodyné Szabadi**, Elen Gócza (2023). "Pluripotency-Associated microRNAs in Early Vertebrate Embryos and Stem Cells" Genes 14, no. 7: 1434. <https://doi.org/10.3390/genes14071434>
- **Tokodyné Szabadi Nikolett**; Tóth Roland; Lázár Bence; Ecker András; Várkonyi Eszter; Liptói Krisztina; Gócza Elen (2023). „Házityúk ősvarsejt tenyészetek, mint a biotechnológiai kutatás modellrendszerei” In: Dániel, Molnár; Dóra, Molnár (szerk.). XXVI. Tavaszi Szél Konferencia 2023: Tanulmánykötet I. Budapest: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ) 572 p. pp 15-25., 11p.
- **Tokodyné Szabadi Nikolett**; Sima Krisztina; Tóth Roland; Lázár Bence; Molnár Mariann; Patakiné Várkonyi Eszter; Gócza Elen (2021). „Házityúk esetében alkalmazható in vitro génmegőrzés, az ősvarsejt tenyészetek jelentősége” In: Szabó, Péter; Simon, Brigitta; Soós, Adrienn; Faludi, Gergely; Fitos, Gábor (szerk.). Kutatás-fejlesztés-innováció az agrárium szolgálatában II. kötet. Budapest, Magyarország: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ) 205 p. pp. 167-180., 14 p.
- **Tokodyné Szabadi Nikolett**; Tóth Roland; Lázár Bence; Gócza Elen. (2020) „KLÍMAVÁLTOZÁS KÁROS HATÁSAINAK KIVÉDÉSE BAROMFIBAN” In: Bihari, Erika; Molnár, Dániel; Szikszai-Németh, Ketrin (szerk.). Tavaszi Szél 2019 Konferencia = Spring Wind 2019: Konferenciakötet I. Budapest, Magyarország: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ) 641 p. pp. 164-171., 8 p.

11.2. A disszertáció témakörén kívüli publikációk

- András Ecker, Bence Lázár, Roland Tóth, Martin Urbán, **Nikolett Tokodyné Szabadi**, Maria Teresa Salinas Aponte, Mahek Adnan, Eszter Várkonyi, Elen Gócza (2023). The Effects of Freezing Media on the Characteristics of Male and Female Chicken Primordial Germ Cell Lines. *Life* (Basel, Switzerland), 13(4), 867. <https://doi.org/10.3390/life13040867>
- Bence Lázár, Mariann Molnár, Nikolett Sztán, Barbara Végi, Árpád Drobnyák, Roland Tóth, **Nikolett Tokodyné Szabadi**, Michael J. McGrew, Elen Gócza, Eszter Patakiné Várkonyi (2021). Successful cryopreservation and regeneration of a partridge colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. *Poultry science*, 100(8), 101207. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101207>
- Tóth, Roland; Lázár, Bence; **Tokodyné, Szabadi Nikolett**; Patakiné, Várkonyi Eszter; Gócza, Elen (2019). „Őshonos magyar tyúkfajták, mint lehetséges univerzális recipiensek az ősvarsejt alapú génmegőrzésben/ Indigenous Hungarian chicken breeds as universal recipients for primordial germ cell-based gene conservation” *Magyar Állatorvosok Lapja*, 141 (7), 439-447., 9 p.

12.Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Gócza Ellen**nek, hogy lehetőséget adott doktori tanulmányaim megkezdéséhez. A számomra biztosított kutatási téma kidolgozása során mindig fordulhattam hozzá kérdéseimmel. A kísérletes munkák és szakirodalmi tudásom bővítése során is fordulhattam hozzá bizalommal. Anyagi forrást nem kímélve biztosította számomra a mintaelemzési technikák elérését, ami emelte dolgozatom színvonalát. Az elmúlt években nemcsak szakmailag, hanem emberileg is támogatott.

Köszönöm **Dr. Liptói Krisztinának** és **Dr. Várkonyi Eszter**nek az NBGK-HGI munkatársainak, hogy lehetőséget biztosítottak a hőkezelési kísérletekhez az állatállomány felneveléséhez, koordinálták a kezelések kivitelezését.

Köszönet illeti a MATE-GBI, Állatbiotechnológia Tanszék, Alkalmazott Embriológia és Össejtbiológia Csoport összes munkatársának, **Dr. Lázár Bencének** a statisztikai analízisek kivitelezésében nyújtott segítségéért és szakmai irányításért, **Dr. Tóth Rolandnak**, **Urbán Martinnak**, **Ecker Andrásnak**, **Maria Teresa Salinasnak** és **Tóth Arnoldnak** a labormunkában nyújtott segédkezésükért.

Nem utolsó sorban ezer köszönet és hála családomnak, férjemnek **Dr. Tokody Dániel**nek a biztatásért, megértésért, gyermekeimnek **Tokody Márton Dániel**nek és **Tokody Olívia Lénának** a türelméért. Édesanyámnak **Szabadi Istvánnának**, édesapámnak **Szabadi Istvánnak** és testvéremnek **Szabadi Viktóriának**, hogy biztosították a lehetőséget a tanulmányaim elkezdéséhez, bátorítottak céljaim elérésében.