

SZAKDOLGOZAT

Bognár Júlia
Mezőgazdasági mérnök

Gödöllő
2025



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

Szent István Campus

Növénytermesztési-tudományok Intézet

Mezőgazdasági mérnök alapképzési szak

Sejtciklus változás monitorozása hőkezelés hatására, csirke

PGC alapú transzgenikus FUCCI sejtvonalakon

Belső konzulens: Tóth Arnold
tudományos segédmunkatárs

**Belső konzulens
intézete/tanszéke:** Állatbiotechnológia tanszék

Készítette: Bognár Júlia
H8QA85
nappali tagozat

**Gödöllő
2025**

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés és célkitűzések.....	3
1.1	Célkitűzések	4
2.	Szakirodalmi áttekintés	5
2.1.	A PGC-k és felfedezésük	5
2.2.	A PGC-k jellemzése és markerei	6
2.3.	A háztyúk embrió fejlődési stádiumai	6
2.4.	PGC-k vándorlása és differenciálódása	7
2.5.	Ivarszervfejlődés	8
2.6.	A baromfiágazat jelentősége, a környezeti tényezők változása és hatásuk	9
2.6.1.	Hőstressz.....	10
2.7.	Génmegőrzési módszerek szükségessége	11
2.8.	In vitro génmegőrzési módszerek.....	12
2.9.	A sejtciklus.....	13
2.10.	FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) konstrukció	14
2.10.1.	FUCCI PGC.....	15
3.	Alkalmazott módszerek	16
3.1.	A vizsgálat helyszíne, alkalmazott sejttypus.....	16
3.2.	Sejtek felolvasztása és tenyésztése.....	16
3.3.	Sejtszámlálás és hőkezelés	17
3.4.	Analízis	18
3.5.	Sejtek mélyhűtése	19
3.6.	Adatelemzés	20
4.	Eredmények és értékelésük	21
4.1.	Prolifерáció	21
4.2.	Sejtciklus változás a kezelések esetében	22

4.2.1.	<i>Kontroll csoport</i>	22
4.2.2.	<i>40°C-os hőkezelésen átesett csoport</i>	23
4.2.3.	<i>41°C-os hőkezelésen átesett csoport</i>	25
4.2.4.	<i>42°C-os hőkezelésen átesett csoport</i>	26
4.2.5.	<i>43°C-os hőkezelésen átesett csoport</i>	27
4.3.	<i>Sejtmarker változás</i>	29
4.3.1.	<i>G₁ sejtfázisban lévő, piros jelet expresszáló sejtek</i>	29
4.3.2.	<i>Mindkét markerre pozitív (S, sárga) sejtek</i>	30
4.3.3.	<i>G₂ sejtfázisban lévő, zölden expresszáló sejtek</i>	32
5.	<i>Következtetések és javaslatok</i>	34
6.	<i>Összefoglalás</i>	35
7.	<i>Irodalomjegyzék</i>	36
8.	<i>Táblázatok és ábrák jegyzéke</i>	39
9.	<i>Mellékletek</i>	40
10.	<i>Hallgatói nyilatkozat</i>	44
11.	<i>Konzulensi nyilatkozat</i>	47

1. Bevezetés és célkitűzések

A baromfiágazat kiemelkedő jelentőségű, mivel a baromfihús az egyik legelterjedtebb állati fehérjeforrás, hiszen az előállítása viszonylag olcsó más állati eredetű fehérjékhez képest, fogyasztásához nem kapcsolódik semmilyen vallási eredetű korlátozás és a tojása teljes biológiai értékű táplálék.

A globális felmelegedés hatására fellépő éghajlatváltozás okozza a baromfitenyésztésben az egyik legsúlyosabb stresszhatást világszerte. Az őshonos fajták általában olyan morfológiai és genetikai tulajdonságokkal rendelkeznek, amelyek segítik a megváltozott környezeti tényezőkhez való alkalmazkodást, ezért a génmegőrzés kiemelkedő fontosságú. Különösen fontos azok a fajták, fajtaváltozatok, tájfajták (ökotípusok) megőrzése, amelyek jó adaptációs képességekkel rendelkeznek és mindemellett biztosítják a megfelelő termelési szintet, megváltozott környezeti tényezők esetén is. Magyarországon számos haszonállat-génmegőrző program működik, amely elsősorban az őseink által behozott és itt meghonosodott fajták nagy számának és az állatok szélsőséges körülményekhez való kiváló alkalmazkodó képességének köszönhető.

A baromfi-géntartalékok *in vitro* megőrzése bonyolultabb más haszonállatainkhoz képest, mivel madarak esetében a nőivar a heterogametikus (ZW) ivar és a hímivar homogametikus (ZZ), tehát a sperma mélyhűtésével, amely az emlősöknél gyakori eljárás, a teljes genetikai anyag nem őrizhető meg. A tojás mélyhűtése a magas szikanyag-tartalom miatt nem kivitelezhető, viszont hatékony eljárásnak bizonyult az ősvarsejteken (PGC-n) alapuló génmegőrzés. Az embrionális vérből könnyen izolálhatóak, majd homogén sejtenyészetek alapítása után génmegőrzésre felhasználhatóak. Később visszajuttathatóak recipiens fajta embriójának szervezetébe és az így létrehozott ivarszervi kimérákkal sikeresen reprodukálható az eredeti donor fajta.

Az éghajlat változás okozta magasabb környezeti hőmérséklet negatív hatással van az állatok anyagcseréjére és hőszabályozási mechanizmusára, ezért kulcsfontosságú megérteni és átlátni az állati szervezetben a hőstressz következtében fellépő folyamatokat, valamint a bekövetkező epigenetikai változások utódgenerációkra való hatását.

Vizsgálataink során, magyar őshonos házityúk ősvarsejtjein végeztünk hőkezelést 40°C, 41°C, 42°C, 43°C-on, majd megfigyeltük a hőkezelés hatására fellépő sejtciklus változást.

1.1 Célkitűzések

A vizsgálataink célja a magyar őshonos házityúk fajták magas környezeti hőmérséklethez való kiváló alkalmazkodóképesség okainak alaposabb megértése. Céljaink között szerepelt még, hogy a későbbiekben lehetővé váljon egy olyan hőkezelési program bevezetése, amellyel a házityúkokat még embrió korban fel lehet készíteni az éghajlatváltozás okozta magasabb környezeti hőmérsékletre. Ez az előzetes hőkezelés segíti a termelés színvonalának megtartását a hőstresszes időszakokban, valamint fontos eleme lehet a génmegőrzésnek is.

A dolgozatom célja, hogy hőkezelés hatására fellépő sejtciklus változásokat detektáljak házityúkból származó FUCCI ősvarsejt tenyészeteket alkalmazva. Három órán keresztül 40°C , 41°C , 42°C , 43°C -on hőkezelt sejtek sejtciklusában bekövetkező változásokat hasonlítottam össze a 38°C -on tartott kontroll sejtek esetében kapott adatokkal.

Eredményeim segíthetnek megállapítani az optimális paramétereket a további hőadaptációs kísérleteinkhez.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. A PGC-k és felfedezésük

Az ősvarsejt (Primordial Germ Cell, PGC) az egyetlen olyan sejtípus, amely képes egy élőlény teljes genetikai információját átadni a következő generáció számára. A legtöbb többsejtes organizmus érett ivarsejtjei, a hímivarsejt és a petesejt, az ősvarsejtekből fejlődnek ki. Ezek a sejtek a korai embriónak csak egy kis részében találhatóak meg és tisztán megkülönböztethetők a szomatikus sejtektől (Kim – Han, 2018). Hosszú távon sikeresen fent lehet tartani a tenyészetét *in vitro*, így hasznos a sejtosztódás mechanizmusainak tanulmányozásában (Tagami et al., 2017).

A XIX. század óta a madárfajokat, különösen a házityúkokat, széles körben alkalmazzák az ivarsejtkutatásban (Kim - Han, 2018). Az ivarsejteket legelőször Waldeyer írta le 1870-ben egy tyúk embrió csírahámszövetében. Nussbaum 1880-ban azt feltételezte, hogy a PGC-k az embriófejlődés jóval korábbi stádiumából származnak. Egy másik tanulmány szerint a PGC-k a házityúk korai embriófejlődésekor az *area pellucida* szélső, félhold alakú részből erednek, valamint a PGC-k a véráram segítségével vándorolnak az embrióban, amint a vérerek kialakulnak a mezoderm rétegben (Swift, 1914). Ám még évtizedeken keresztül hiányos maradt a PGC-k részletes leírása a megbízhatatlan markerek miatt (Kim – Han, 2018).

Swift (1914) feljegyezte, hogy az ősvarsejtek megkülönböztethetők a körülöttük lévő sejtektől a méretük és a citoplazmában jelenlévő számos glikogén *granula* alapján. Majd Meyer (1960; 1964) azt találta, hogy ezeknek a nagy glikogén *granula*-knak a hisztokémiai festésével már a korai embrionális stádiumokban is beazonosíthatóak a PGC-k. Az 1960-as évek végén Clawson és Domm azt feltételezte, hogy az ősvarsejtek a primitív csík kialakulása előttről származnak. Ezeket a sejteket Perjódsav Schiff (PAS, Periodic Acid-Schiff) reagenssel festették meg a Hamburger és Hamilton (HH) 4-7. stádiumok között. A kísérlet eredményeiből arra jutottak, hogy már 100-250 PGC volt jelen az embrióban (Clawson – Domm, 1969). Ginsburg és Eyal-Giladi (1987) azt állapította meg PAS festési eredmények alapján, hogy a PGC-k már korábban jelen vannak, mint EGK X stádium (a tojásrakás pillanata) és a további differenciálódásuk független az embriófejlődési folyamatoktól.

2.2. A PGC-k jellemzése és markerei

A házityúk PGC-knek különös elhelyezkedésű, nagy, gömbölyű sejtmagja és elhatárolható sejtmagvacskája van, valamint számottevő lipid granula található a citoplazmában. Átmérőjük 10-20 µm. Könnyen megkülönböztethetőek a vörösvérsejtektől jellegzetes morfológiájuk és nagyobb méretük miatt (Tagami et al., 2017). A citoplazma magas glikogén tartalma miatt elterjedt a Perjódsav Schiff (PAS) festése (Meyer, 1960; 1964). Azonban ez a festési módszer csak a primitív csík kialakulása után, a HH 4. stádiumtól (18-19 órával az inkubáció megkezdése után) alkalmas a PGC-k kimutatására (Tagami et al., 2017).

Anyai úton öröklődő komponensekből erednek, amelyet alátámasztja az is, hogy *CVH*-t (*Chicken Vasa homologue*) expresszálnak, ami ivarsejt specifikus. Megbízhatóan használható markerként, mivel már a barázdálódástól kimutathatóak vele a PGC-k (Kim – Han, 2018). A *VASA* gént széles körben alkalmazzák, mint specifikus marker, mivel mindkét nem ősvarsejtjeiben expresszálódik. Ez egy DEAD-box RNS helikáz és az ivarsejtek citoplazmájában található meg (Tsunekawa et al., 2000). A mitokondriális felhőt és a spektrin fehérjével dúsított struktúrát veszi körül az oocitákban és ott granulofibrilláris alakban található meg (Kim – Han, 2018). Felhasználható még az RNS-kötő fehérje és a tyúk dead end homológ (*DNDI*) is, ami a PGC-k középpontjában található meg (Aramaki et al., 2007; 2009). A *DAZL* (*deleted in azoospermia-like*) szintén egy csíravonal-specifikus RNS-kötő fehérje, amely a csírasejtek citoplazmájában és sejtmagjában is jelen lehet. Ez a fehérje a 15 napos nőivarú embrió csírasejtjeiben még kimutatható, azonban a fiatal tyúk petefészkéből már hiányzik. (Kito et al., 2010). Lee et al. (2016) megfigyelte, hogy a *DAZL* fehérje kezdetben a kortexben lokalizálódik, majd a növekedés során a citoplazma központjába kerül, és megjelenik a zigóta barázdálódásakor. Az abnormális *DAZL* expresszió hatással lehet a PGC osztódására, génexpresszióra és az *in vitro* apoptózisra, így feltételezhető, hogy szerepet játszik a házityúk ivarsejtjeinek integritásában (Lee et al., 2016).

2.3. A házityúk embrió fejlődési stádiumai

A házityúk embrionális fejlődése a megtermékenyüléssel kezdődik, ami a petevezetékben történik, utána, a következő 21 napon pedig a tojásban fejlődik tovább az embrió.

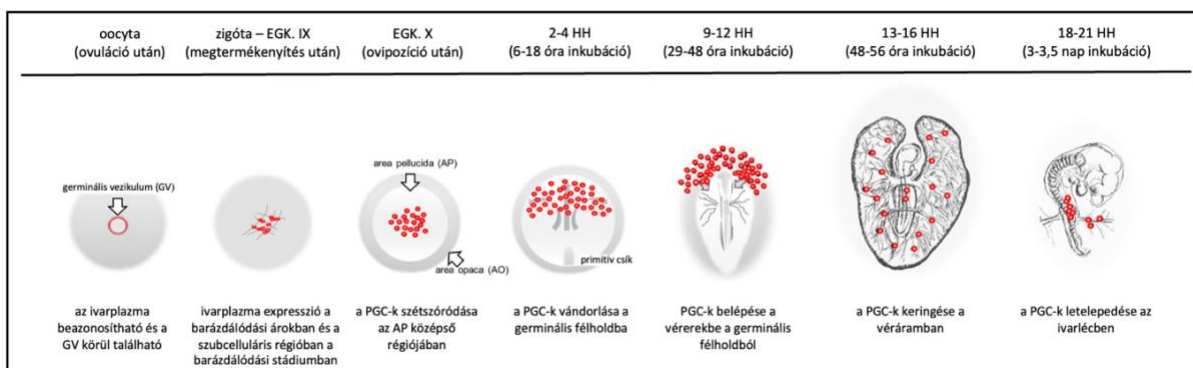
Eyal-Giladi és Kochav (1976) nyújtotta az első 14 stádiumból álló morfológiai leírást a korai házityúk embrióról az ovipozíció előttről (EGK stádiumok, jelölésük római számokkal

történik). Az I. stádiumban az embrió egy csíralemezből áll és kevesebb, mint öt osztódáson mentek keresztül a sejtjei. A XIV. stádiumban az embriónak már kifejlett hipoblasztja van. Ez általánosan egyenértékű az HH 1. stádiummal.

Hamburger és Hamilton (1951) felosztotta a házityúk embrió alaki fejlődésének különböző részeit a tojásrakás pillanatától a kelésig (21 nap) 45 stádiumra (HH stádium, jelölésük arab számokkal történik). Három fő fázist határoztak meg: korai, középső és késői stádiumokat. A korai stádiumokban (1-6) kifejlődik a primitív csík. A középsők (7-14) fázisok főleg a szomiták száma és a kapcsolódó tulajdonságok által vannak definiálva. A végső stádiumokban (15-45) számos tipikusan morfológiai tulajdonság alakul ki, valamint csoportosíthatóak standard módon mérhető paraméterek alapján. A fejlődés vége felé az embrióban már nem történik több morfológiai változás, csak méretbeli növekedés (Hamburger – Hamilton, 1992).

2.4. PGC-k vándorlása és differenciálódása

A PGC-k a legtöbb gerinces és gerinctelen állatfajban nem a gonádokból erednek, hanem az embrió fejlődése során odavándorolnak (Tagami et al., 2017). Az ősvarsejtek a házityúk embrióban az EGK X stádiumban az *area pellucida* középső részéről az epiblaszt rétegből származnak (Eyal-Giladi et al., 1981). Először passzív mozgással az *area pellucida* középső részéről az elülsőbe mennek a primitív csík fejlődésének hatására, majd hozzátapadnak az *area pellucida* epiblasztjának az alsó membránján található rostos szalagokhoz (Wakely – England, 1979). Ezután aktív mozgással eljutnak a germinális félholdba vonzó és taszító jelek hatására (1. ábra) (Kang et al., 2015).



1. ábra: A PGC-k vándorlása (Kim – Han, 2018)

A PGC-k kilépnek a vérerekbe a HH 9-10. stádiumban, ezeket cirkuláló ősvarsejteknek (circulating PGC, cPGC) is nevezik. Ez egy különleges biológiai tulajdonság, ami csak a madarakra és néhány hüllő fajra jellemző (Tagami et al., 2017), mivel az emlősökben a szövetek között történik a vándorlás (Molyneaux – Wylie, 2004). Vándorlás során a legmagasabb koncentrációt a HH 14. stádiumban éri el (Tajima et al., 1999). A véráramban keringő PGC-k kemotaxikus jelek hatására (Stebler et al., 2004), lamellipodiumok kiterjesztésével elérkeznek a cölomikus epitéliumhoz, amely megvastagszik és ivarléccé válik (Swartz, 1982; Didier et al., 1990; Yoshinaga et al., 1992). A legtöbb ősvarsejt az ivarlécben halmozódik fel, azonban nagyjából 10% a gonadális területen kívül található meg, az embrió feji részén, az ősveseben és a bél membránjában. Ezek a PGC-k végül megsemmisítődnek, többnyire apoptózis által (Swift 1914; Nieuwkoop – Sutasurya, 1979; Nakamura et al., 2007).

Miután a PGC-k megérkeznek az embrionális gonádokba, osztódni kezdenek, a számuk növekszik. Ezeket a PGC-ket gonádból származó ősvarsejteknek (gonadal PGC, gPGC) is hívják. A még nem differenciálódott gonádokból kialakul az ivarléc (Romanoff, 1960), és megtörténik a nemi differenciáció a HH 29. stádiumban (az inkubáció 6. napján) (Tagami et al., 2017).

2.5.Ivarszervfejlődés

A gonádok hímvivaran szimmetrikusan, a nőivvarban aszimmetrikusan fejlődnek ki az ivari kromoszómákon található gének hatására. Hímvivar esetében ivarérett korra mindkét here kifejlődik, míg nőivvarban a legtöbb madárfajnál csak a baloldali gonádból fejlődik funkcionális petefészek. A jobb oldali gonád nem fejlődik ki teljesen, felnőtt korra csökevényes formában marad vissza (Stevens, 1997). A PGC-k gonádokba történő integrációjában is eltérés figyelhető meg a két oldal között mindkét nem esetében, a bal oldali gonádokba több ősvarsejt vándorol és lesz megtalálható (Intarapat – Stern, 2014).

A hímvivar ivarsejtjei nem osztódnak aktívan a gonadális nemi differenciáció után (Mendez et al., 2005), míg a nőivvar ivarsejtjei a HH 35. stádiumtól (9 nappal az inkubáció kezdete után) elkezdenek osztódni. Továbbá a meiózis csak a nőivvarban kezdődik el az embrionális fejlődés későbbi stádiumaiban (Tagami et al., 2017).

A hímvivar ivarsejtjei a herékben ondósejtté, a nőivvar ivarsejtjei a bal petefészekben petesejtté differenciálódnak, a jobb oldaliban pedig a kelésig apoptózis által elhalnak. Ezt a folyamatot a

PGC-ket körülvevő gonadális szomatikus sejtek által kibocsátott számos faktor idézi elő (Tagami et al., 2017).

2.6. A baromfiágazat jelentősége, a környezeti tényezők változása és hatásuk

A baromfiágazat kiemelkedő jelentőségű, mivel a házityúk a világ egyik legnagyobb egyedszámban tenyésztett faja. Fogyasztása széleskörűen elterjedt, mivel nem vonatkoznak rájuk vallási vagy kulturális korlátozások és hatékony állati fehérje előállítás teszi lehetővé a baromfihús és a tojástermelő ágazatokban (Tokodyné Szabadi et al., 2024). 2023-ban hazánkban az egy főre eső éves baromfihús fogyasztásának mennyisége elérte a 36,3 kg-os vágott tömeget, az egy főre eső tojás fogyasztásának mennyisége pedig 233 db volt. A termelés mérete ugyanebben az évben a baromfihúsból megközelítőleg fél millió tonna volt, tojásból pedig 2327 millió darab volt (KSH, 2025).

A globális felmelegedés és az éghajlatváltozás hatására a környezeti tényezők, mint például a hőmérséklet és a páratartalom egyre szélsőségesebb éves és szezonális szinten egyaránt, valamint extrém éghajlati események is egyre gyakrabban fordulnak elő. Ez hatással van az állatok anyagcseréjére és hőszabályozási mechanizmusára. A homeosztázis fenntartása energiaigényes folyamat, amelyet a környezeti tényezők változása tovább nehezít, így esetlegesen az állat elhullásához is vezethet (Rojas-Downing et al., 2017). Az éghajlatváltozás okozta káros hatások közül a hőstressz okozza a baromfitenyésztésben az egyik legsúlyosabb stresszhatást világszerte, mivel negatívan befolyásolja a szaporodásbiológiai és a termelési paramétereket (Lara – Rostagno, 2013). Ide lehet még sorolni a takarmányok összetételének állandó változását a rendelkezésre álló alapanyagok folyamatos változása miatt, valamint az új kórokozók megjelenését is (Godde et al., 2021)

Az állatok alkalmazkodását a kedvezőtlen éghajlati viszonyokhoz a morfológiai, anatómiai, viselkedési, fiziológiai, biokémiai, sejtes és molekuláris mechanizmusok együttese teszi lehetővé (Das et al., 2016). Az őshonos fajták általában olyan genetikai és morfológiai jellemzőkkel rendelkeznek, amelyek segítségével könnyebben alkalmazkodnak a kevésbé optimális környezeti körülményekhez, ellentétben a jobb termelési paraméterek elérésére célzott szelekcióval kialakított brojlerrel (Soleimani et al., 2011). A magasabb környezeti hőmérséklethez és az extenzívebb takarmányozáshoz a jól alkalmazkodó baromfifajták szélesebb körben felhasználhatóak (Hoffman, 2010).

A régi magyar baromfifajták kiválóan alkalmazkodnak a szélsőséges környezeti feltételekhez, extenzív termelési körülmények között termelésük meghaladta a várakozásokat (Dong Xuan et al., 2017). Kiváló hústermelő képességekkel rendelkeznek (Báldy, 1954; Szalay, 2015), valamint jó a tojástermelési képességük is (Lan Phuong et al., 2014; Bódi et al., 2015). Elképzelhető, hogy a Kárpát-medencében kialakult haszonállatfajták a világ legtöbb helyén életképesek és termelésre alkalmasak maradnak (Dong Xuan et al., 2017).

2.6.1. Hőstressz

A hőstresszel kapcsolt genetikai markerek felhasználhatóak biomarkerként, mivel azonosításra kerültek az őshonos házityúk fajtákban. Fiatalkori hőkezelés hatására létrehozható olyan állomány, amely tolerálja a magasabb környezeti hőmérsékletet. Javítható a házityúk adaptációs képessége, a tojástermelés és az életképes embriók aránya is szignifikánsan nő hőstressz esetén a kontroll (hőkezelésen át nem esett) csoport egyedeihez képest. A hőkezelés okozta epigenetikai változások az utód generációkra is átadódnak, mivel az utódok ősvasejtjeiből létrehozott sejttenyészetekből is kimutatható a hőstressz során szerepet játszó faktorok expressziós szintjének a változása (Lázár et al., 2023, Tokodyné Szabadi et al., 2024, Tóth et al., 2021).

Vizsgálati eredmények alapján elmondható, hogy a hősokkfehérjék (*HSP70*, *HSP90*) és a hősokkfaktorok (*HSF1*, *HSF2*, *HSF3*, *HSF4*) expressziója kimutatható volt a házityúk fajtákból származó agyszövetmintákban fiatal és felnőtt korban egyaránt. A kendermagos erdélyi kopasznyakú kakasok agyszövetmintáiban a *HSF1* expressziója szignifikánsan nagyobb eltérést mutatott. A *HSP70* és *HSF4* expressziója szignifikánsan emelkedett hőkezelt nőivarú egyedek ivarszervében. Felnőtt tojóknál a *HSF2* és *HSF3* expressziója jelentősen alacsonyabb volt a kontrollhoz képest. Hőkezelt felnőtt kakasokban a *HSP70*, *HSF1* és *HSF3* expressziós szintje mindkét ivarszervben szignifikánsan megnövekedett a kontrollhoz viszonyítva (Tokodyné Szabadi et al., 2024, Tóth et al., 2021).

Továbbá kimutatták a miR-138 expresszóját az agyszövetben és megfigyelték, hogy az expresszió szintje a hőkondicionálás hatására csökken ivarérett korban. Hímivarban ez az eltérés szignifikáns volt. Hőkezelés hatására a miRNS kifejeződési mintázatában létrejövő változások közvetlen információval szolgálhatnak a molekuláris folyamatokról, amelyek az állatok adaptációs képességében szerepet játszanak (Tokodyné Szabadi et al., 2024).

Ezek az eredmények igazolták a fiatal korban történő hőkonkondicionálás fontosságát (Tokodyné Szabadi et al., 2024, Tóth et al., 2021).

2.7. Génmegőrzési módszerek szükségessége

A géntartalékvédelmi (fajtavédelmi) rendszer alapja a génbank, mivel a haszonállatok (fajok, fajták, típusok, változatok, populációk) genetikai információs készletét megőrzi. Módszerei közé tartozik az *in vivo*, élő állapotban történő, *in situ*, saját eredeti élőhelyén, hagyományos módon, *ex situ*, nem az eredeti élőhelyén, mesterséges körülmények között tartott egyedek és/vagy állományok vagy *in vitro*, laboratóriumi körülmények között, mélyhűtve tárolt szaporító- vagy örökítő anyag. A génmegőrzés célja a fajtavédelem alapvető szempontjainak figyelembevételével a fajtatisztán megőrzött haszonállatok tovább tenyésztése és hasznosítása árutermelésre, adott esetben haszonállat-előállító keresztezésre az állomány eredetiségének megtartásával, szükség esetén helyreállításával, hasznosításával és létszámának vagy minőségének fejlesztésével termelés közben (Szalay – Koppány, 2017). Fő feladata az erőforrások használatával faji szinten a legnagyobb diverzitás fenntartása. Egyik fő paramétere a genetikai távolság és a genetikai azonosság mértéke. A génmegőrzés nem csak a klasszikus értelemben vett fajtákra vonatkozik, fontos megőrizni azokat a fajtaként ismert, de inkább földrajzilag elkülöníthető populációkat is, amelyek tudatos tenyésztésen nem estek át a termelési célokat illetően és küllemileg sem egységesek (Pálinkás-Bodzsár – Hidas, 2017).

A génmegőrzés szükséges lehet abban az esetben, ha egy populáció mérete 10 000 egyedszám alá csökken. A fennmaradás esélye több tényezőtől függ, többek között a populációmérettől, az effektív populációméret csökkenési rátájától, ezen belül is a populáció ivararányától és korösszetételétől, a beltenyésztettség fokától, a véletlenszerű génsodródástól, a kiinduló populáció genetikai varianciájától és a génmegőrzési program hosszától. Egy kisméretű populáció megőrzésének legfőbb szempontja a gén- és allélvesztés elkerülése és a populáció teljes génkészletének védelme. Ha a homozigóta egyedek aránya növekszik a populáción belül, akkor az adaptációs képesség csökken, a beltenyésztettség miatt leromlás figyelhető meg, végső esetben a populáció kihal. Egy populáció genetikai diverzitása a populációt alapító állatok számának és azok populációgenetikai diverzitásának függvénye, valamint az effektív populációméret is fontos tényező lehet (Szalay – Koppány, 2017).

2.8. *In vitro* génmegőrzési módszerek

Az *in vitro* génmegőrzés véghezvihető hím szaporítóanyag tárolásával, akár hosszú távon is, az ondó mélyhűtésével. Ez egy nagyon gyakorlatias eljárás és sok faj esetében rutinszerűen alkalmazható, segíti a genetikai sokszínűség megőrzését (Holt, 1997). Lehetőség van a spermium ivarspecifikus mélyhűtésére is, amelyet egy szexuális folyamat előz meg, ám eredményessége alacsonyabb (Garner – 2008).

Az ivarszervszövet-átültetés segítségével végzett génmegőrzési módszer megfelelő alternatívát nyújthat szaporodási, egészségügyi, technológiai problémák esetén az ivarszervszövet mélyhűtésével és transzplantációjával (Lipóti – Váradi, 2017).

Madarak esetében a tojás krioprezervációja lenne a legkézenfekvőbb megoldás, azonban a tojás magas szikanyag-tartalma miatt jelenleg ez nem lehetséges. A spermiumok mélyhűtése számos madárfajnál kidolgozott eljárás (Hammerstedt – Graham, 1992; Lake – Stewart, 1978; Dubos et al., 2006; Łukaszewicz et al., 2004; Barna et al., 2010; Váradi et al., 2013), azonban hatékonysága eltérő lehet fajok, fajták, vonalak, akár egyedek között is (Alexander et al., 1993; Chalah et al., 1999; Tajima et al., 1990). További probléma, hogy a madarak esetében a tojó a heterogametikus ivar, ZW ivari kromoszómákkal rendelkezik, ezért a spermium mélyhűtésén alapuló génmegőrzési módszerek önmagában nem képesek a W ivari kromoszómában, valamint a mitokondriális DNS-ben raktározott információk megőrzésére (Patakiné Várkonyi et al., 2017).

Lehetséges eljárás még az embrionális sejtek mélyhűtése, majd azok a recipiens embrióba való visszaültetése felolvasztás után, amellyel a nőivar teljes genetikai anyaga is megőrizhető (Naito, 2003; Tajima, 2002). Embrionális eredetű sejtek felhasználásával történő kiméra-előállítás véghez lehet vinni blasztodermális (Bc) sejtttranszferrel, cirkuláló primordiális ősvasejtekkel (cPGC), melyeket a HH 13-14. stádiumokban lehet kinyerni az embrió vérkeringéséből, valamint gonádból származó ősvasejtekkel (gPGC), melyeket a HH 27-31. stádium között lehet kinyerni az ivarszervekből. A sejtek recipiens embrióba történő injektálása a HH 13-16. stádiumok során eredményezi a legtöbb kiméra utódot (Patakiné Várkonyi et al., 2017). Az ősvasejtek mélyhűtése megoldott, valamint mindkét nemből származó ősvasejtek izolálására és hosszú távú *in vitro* tenyésztésére is van mód (van de Lavoie et al., 2006; Whyte et al., 2015), így a teljes genom megőrzésére alkalmas (Patakiné Várkonyi et al., 2017). Ezek a technikák azonban még fejlesztés alatt állnak, hatékonyságuk még nem megfelelő és túl költségesek a szélesebb körű genetikai konzervációs programok megvalósításához (Petitte,

2006). Fontos gyakorlati szempont, hogy az ellenkező nembe injektált fejlődő ivarsejtek csak ritka kivétellel tudnak funkcionálni, érett ivarsejtekké alakulni (Liu et al., 2017; Naito et al., 1999), viszont a genetikai információ ősvarsejtek formájában való tárolása biztonságos, ráadásul jóval olcsóbban és hatékonyabban szállíthatóak (Patakiné Várkonyi et al., 2017).

2.9. A sejtciklus

A sejtciklus a szervezeten belül az egyik legfontosabb folyamat, amely lehetővé teszi a genetikai információ duplikációját és transzmisszióját a következő sejtgeneráció számára. A folyamat során a DNS-nek pontosan kell replikálnia, valamint egyforma másolatnak kell kerülnie a kromoszómákból a létrejövő sejtekbe (Israels – Israels, 2000).

A sejtciklus elkülöníthető fázisokból áll. G_1 (gap 1) a szünet a mitózis (M fázis) és a DNS szintézis (S fázis) között, a folyamat során a sejt növekszik és felkészül a DNS átírásra. A G_1 során a sejt alá van rendelve az extracelluláris mitogének stimulációjának és a növekedési faktoroknak. Ennek köszönhetően a G_1 befejeződésével belép az S fázisba, ahol megtörténik a DNS szintézis. A G_2 (gap 2) a szünet a DNS szintézis befejeződése és a mitózis (M fázis) között. Az M fázis alatt létrejönnek a bipoláris mitotikus orsók, megtörténik az iker kromatidák szegregációja és a sejtosztódás. A sejtciklus szabályozása gondoskodik róla, hogy minden fázisban minden esemény végbe menjen, mielőtt a következő fázis következne. Ezért a DNS épségét figyelő ellenőrzőpontok stratégikusan a G_1 fázis utolsó harmadában (restrikciós pont, R), az S fázisban vagy a G_2 és M fázis határán vannak elhelyezve, a mutáns vagy sérült sejtek fejlődésének és elterjedésének megelőzésére. A sérülés mértékétől függően a hiba kijavítódik, vagy a mitózis nem megy végbe. A G_0 fázisban azok a sejtek vannak, amelyek ideiglenesen vagy véglegesen kiesnek a ciklusból (Israels – Israels, 2000).

Külső ingerektől (mitogénektől és növekedési faktoroktól) függ, hogy egy normális sejt ki tud-e lépni a G_0 és a G_1 fázis korai szakaszából. A sejt válaszol ezekre a külső ingerekre, amelyek intracelluláris foszforilációs kaszkádon keresztül közvetítődnek, úgy, hogy felül szabályozza a *ciklineket*, amelyek kapcsolatban vannak a *ciklin-dependens kinázokkal* (CDK). A *ciklin* a szabályozó egység, a CDK pedig a katalitikus partnere. Ezek együttesen a sejtciklus elkülöníthető stádiumaiban funkcionálnak. Minden *ciklin* szintje egymástól függetlenül nő és csökken a sejtciklus fázisai során. A *ciklin*/CDK komplexek egyéni fehérje szubsztrátot foszforilálnak, hogy a sejtet a ciklusban tovább mozgassák. Ez a DNS szintézis aktivációjával a késői G_1 és S fázisban, valamint a mitózissal kapcsolatos strukturális alkotóelemek

megalkotásával a késői G₂ és az M fázisban jön létre. A *ciklinek* perioditása, amely a szintézisük és a későbbi proteolitikus degradációjuk által van összekapcsolva, biztosítja a sejtciklus stádiumai között az átmenetet (Israels – Israels, 2000).

A G₁ kezdetén megnövekszik a *D ciklinek* (*D1*, *D2*, *D3*) expressziója. Az aktivált *CDK*-k foszforilálják a retinoblasztóma (RB) fehérjét. Az RB fehérjének kritikus szerepe van a G₁ fázis előrehaladásának szabályozásában a restrikciós ponton keresztül. Ha bekövetkezik a genom sérülése, akkor a ciklus késleltetve lesz vagy félbemarad. A *p53*-as transzkripciós faktor szakítja meg a ciklust, hogy időt adjon a DNS megjavítására. Ha a DNS sérülése meghaladja a sejt javítóképességét, akkor a *p53* irányításával a sejtben apoptózis megy végbe a pro-aptotikus (Bax) fehérje expressziójának előidézésével (Israels – Israels, 2000).

A késői G₁ fázisban megnövekszik az *E ciklinek* expressziója. Az *E ciklin/CDK2* komplex a G₁-ből az S fázisba történő átmenethez szükséges. Amennyiben a sejt áthalad a G₁ fázison és a mitotikus jelek hiányoznak a sejt differenciálódhat, megtörténhet az apoptózis vagy elcsendesülhet (G₀) (Israels – Israels, 2000).

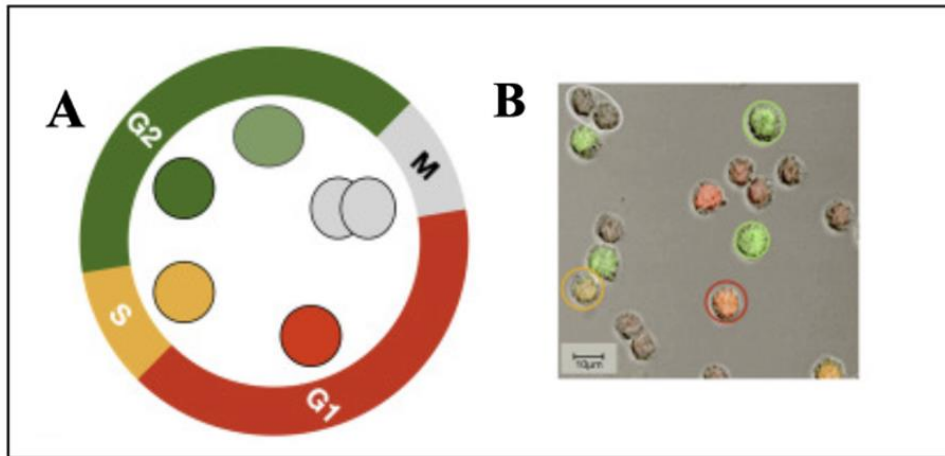
Az *A ciklin* expressziója megnövekszik a G₁ és az S átmenete során és tart az S fázis alatt is. A *CDK2*-vel való összekapcsolódásával végbemegy a DNS szintézis (Israels – Israels, 2000).

A G₂-ben található ellenőrzőpont a DNS sérülésre vagy a nem teljes DNS szintézisre válaszol, a mitózisba való áthaladás késik, hogy végbe mehessen a DNS megjavítása vagy a ciklus nem megy végbe (Israels – Israels, 2000).

Az *A és B ciklinek CDK1*-gyel alkotott komplex hatására megy végbe a mitózis (Israels – Israels, 2000).

2.10. FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) konstrukció

A FUCCI (fluorescens ubikvitináció alapuló sejt ciklus indikátor) egy transzgenikus eszköz, amely a sejtciklus során periodikusan változó fehérje expresszió alapul (Sakaue-Sawano et al., 2008). Ezt a folyamatot többnyire a foszforiláció és az ubikvitiláció szabályozza (Nakamaya – Nakamaya, 2006). Magában foglalja a kromatin licencelést, a DNS replikáció 1-es faktorához (Cdt1) kapcsolódó monomerikus Kusabira-narancs és a Gemininhez kapcsolódó monomerikus Azami-zöld fluoreszcens fehérjét. Ennek hatására a sejtek a G₁ fázisban piros, a G₂ fázisban pedig zöld jelet expresszálnak. Az S fázisban mindkét jel egyszerre látható, ami sárga szín detektációját eredményezi (2. ábra) (Sakaue-Sawano et al., 2008).



2. ábra: A: a FUCCI sejtek által expresszált jelek változása a sejtciklus során, B: FUCCI PG sejtek (Ecker et al., 2024)

A FUCCI komplex 2008 -as kifejlesztése óta használták már többek között humán sejtekben, egérben, zebrafishban és már házityúk PGC -ben is elérhető (Sakaue-Sawano et al., 2008; Zielke – Edgar, 2015; Ecker et al., 2024).

Felhasználható a sejtek megfigyelésére élő állatokban (Pfeiffer et al., 2018; Tomura et al., 2021), a sejtosztódás vizualizálására (Abdulhasan et al., 2022; Koh et al., 2017; Sakaue-Sawano et al., 2008), valamint rákos sejtek vizsgálatára (Prasedya et al., 2016; Yano – Hoffman, 2018).

2.10.1. FUCCI PGC

A házityúk PGC-k FUCCI vektorral való modifikációja elektroporációval történt. Sikeressége konfokális mikroszkópiával, DNS szekvenálással, valamint *time-lapse* videó analízissel nyert adatok alapján került bizonyításra.

Alkalmazásukkal kimutatható a toxikus anyagok és a hőmérséklet változásának a sejtciklusra gyakorolt hatása, valamint segíti a kultúrák minőségének monitorozását és a médiumok alkalmasságának tesztelését is (Ecker et al., 2024).

3. Alkalmazott módszerek

3.1. A vizsgálat helyszíne, alkalmazott sejttípus

A kísérleteket a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetemen, a Genetika és Biotechnológia Intézet, Alkalmazott Embriológia és Őssejt Biológia Csoport laboratóriumaiban végeztem. A szakdolgozati munkám során végzett vizsgálatokhoz speciális állatkísérleti engedélyre nem volt szükségem.

A vizsgálat során Ecker András által alapított FUCCI vektort tartalmazó plazmid DNS-el elektroporált házityúk ősvarsejt vonalakkal dolgoztam (Ecker et al., 2024).

3.2. Sejtek felolvasztása és tenyésztése

Szakdolgozati munkám során két sejtvonallal dolgoztam, ezek a nőivarú FCF5 és a hímivarú FCM5 voltak. Ezek a vonalak a hosszútávú tárolás során -150°C -on vannak tárolva. Vonalként egy-egy csövet olvasztottam fel: egy percre 37°C -os vízfürdőbe helyeztem a csöveket, majd steril fülke alatt átpipettáztam őket 1,5ml-es Eppendorf csövekbe, és 3 percig 1000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszót leszívtam, majd a pelletet 500 μl steril PBS-el átmostam, ezzel eltávolítva a fagyasztómédium DMSO tartalmát. Ezt újabb centrifugálás követte. A PBS-t is eltávolítottam és 600 μl friss médiumot helyeztem a sejtekre, majd egy 48-as plate-re pipettáztam a sejteket, 2-2 well-be. Négy hét tenyésztés után a sejtek elérték a megfelelő mennyiséget (80 000 db sejt/300 μl médium) és tisztaságot.

A sejteket médium csere előtt minden alkalommal szemrevételeztem inverz mikroszkóppal. A médiumcserét hétfőn, szerdán és pénteken végeztem el, előmelegített médiummal, steril fülkében. A tenyésztőmédium komponensei az 1. táblázatban láthatók. A kultúrák Sanyo MCO-19AIC (UV) CO_2 Inkubátorban (Sanyo, Osaka, Japan, 10040162) 38°C -on, 5%-os CO_2 koncentráció mellett voltak tenyésztve.

Mennyiség (ml)	Komponens	Gyártó
34,8	Kalcium mentes DMEM	Gibco, Billings, MT, USA, 21068-028
10,8	Tissue culture-grade víz	Gibco, Billings, MT, USA, A12873-01
0,665	Piruvát	Gibco, Billings, MT, USA, 11360039
0,465	MEM vitamin oldat	Gibco, Billings, MT, USA, 11120052
0,465	MEM amino savak	Sigma, St. Louis, MO, USA, M5550
1	B27 kiegészítő	Gibco, Billings, MT, USA, 17504044
0,5	Glutamax	Gibco, Billings, MT, USA, 35050038
0,5	Nem Esszenciális Amino Savak	Gibco, Billings, MT, USA, 11140035
0,5	Nukleozidok	EmbryoMax, Munich, Germany, ES-008-D
0,1	B-Mercaptoetanol	Gibco, Billings, MT, USA, 31350010
0,075	CaCl ₂	Sigma, St. Louis, MO, USA, C4901-100G
0,5	Ovalbumin	Sigma, St. Louis, MO, USA, A5503
0,1	Na Heparin	Sigma, St. Louis, MO, USA, H3149-25KU
0,1	Penicillin–Streptomycin elegy	Gibco, Billings, MT, USA, 15070-063
0,005	Humán Activin	Invitrogen, Waltham, MA, USA, PHC9564
0,002	bFGF2	Gibco, Billings, MT, USA, 13256-029
0,005	Ovotransferrin	Sigma, St. Louis, MO, USA, C7786

1. táblázat: A tenyésztőmédium összetevői és azok mennyisége (Whyte et al., 2015)

3.3. Sejtszámlálás és hőkezelés

Mikroszkópos vizsgálat után vonalanként 1-3 well-nyi sejtet összegyűjtöttem egy-egy Eppendorf csőbe. A csöveket centrifugába helyeztem 3 percre 1000-es fordulatszámon. A médiumot leszívtam figyelve, hogy a sejtek a cső aljában maradjanak, majd 550 µl PBS-el átmostam a sejteket. Sejtszámlálást és piros–zöld arány számolást végeztem NanoEntek Arthur

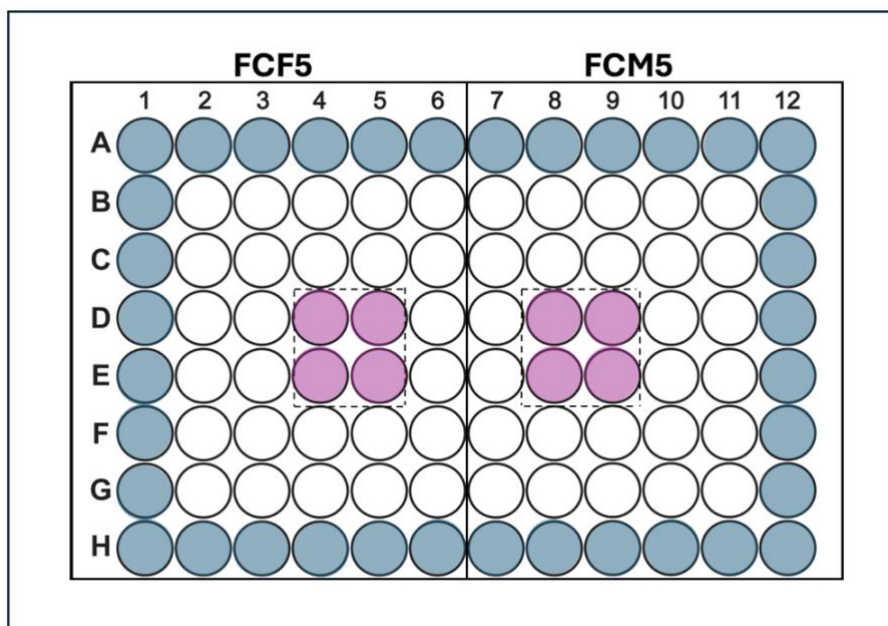
Novel Fluorescence Sejtszámláló készülékkel (NanoEntek, Seoul, Korea), úgy, hogy a csőben a sejteket átszuszpendáltam, majd 25-25 µl-t a tárgylemez két oldalán található nyílásba helyeztem. Mindkét vonalat külön tárgylemezen vizsgáltam.

A méréseket egységes beállításokkal végeztem, a sejtméret 10-25 µm, a zöld detektálási küszöbérték 1250 nm, a piros detektálási küszöbérték 870 nm voltak. A sejtszámlálás alapján kiszámoltam, hogy hány µl PBS-ben van a méréshez szükséges sejtmennyiség. A hőkezeléshez feliratoztam vonalanként 1-1 új Eppendorf csövet, amibe előkészítettem 480 µl előmelegített médiumot, majd ezekhez hozzáadtam a kiszámolt mennyiségű sejtszuszpenziót.

A hőkezelést Eppendorf Thermomixer (Eppendorf, USA) készülékkel végeztem 3 órán keresztül, 300 rpm rázatás mellett, hogy a sejtek ne ülepedjenek le. 5 csoportot alkalmaztam: 38°C kontrol, valamint 40°C, 41°C, 42°C, 43°C -os hőkezelt vizsgálati csoportokat.

3.4. Analízis

A hőkezelés után a sejteket 96-os Greiner CellStar plate-re helyeztem, mert ez a plate kompatibilis az analízisre használt automata mikroszkóppal. A plate-et két oldalra osztottam úgy, hogy az egyik oldalon az egyik vonal helyezkedett el, a másikon a másik. A kezelésben használt sejtszuszpenziókat vonalanként 4 well-re osztottam le, 120 µl/well mennyiségben, 2x2-es elrendezésben. A plate-en körben, a szélső well-eket PBS-el töltöttem fel a párolgás mértékének csökkentése miatt. A plate elrendezése a 3. ábrán látható.

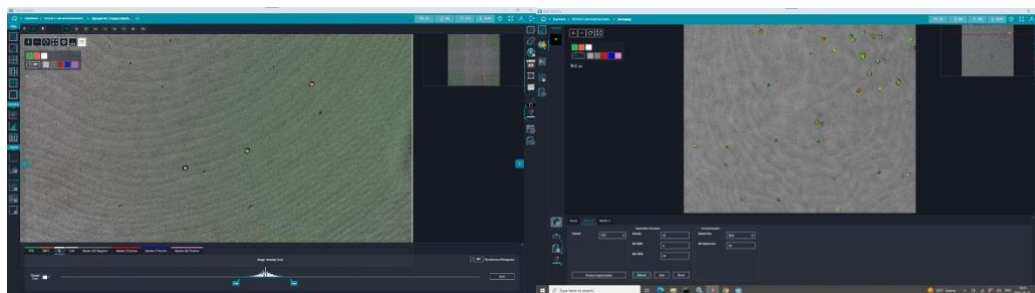


3. ábra: A plate elrendezése

A sejtek megfigyelésére ImageXpress Pico (Molecular Devices, USA) automata sejtszámláló készüléket használtam. A készüléken belül a plate egy mágnesesen zárt környezeti kamrában volt, így a sejtek normál inkubációs körülményeknek megfelelő módon, 5% CO₂ szint és ideális páratartalom mellett voltak tartva és fényképezve. A sejtek 48-órán keresztül tartózkodtak a műszerben, 6 óránként készült róluk felvétel és sejtszámlálás a kiválasztott well-ekről.

A mikroszkóp a sejtek azonosítását és számolását áteső fény mellett végezte, ehhez a fókuszot úgy kellett beállítani, hogy a sejtek erős kontrasztot mutassanak a háttérhez képest. A zölden expresszálo sejteket FITC szűrővel (494/520 nm), a pirosan expresszálo sejteket TRITC szűrővel (541/572 nm) vizsgáltam (4. ábra, jobb oldal). Ezeknek a sejteknek a biztos detektálásához a különböző csatornák maszkolását manuálisan állítottam be (4. ábra, bal oldal), majd egy kiválasztott well próba mérésével ellenőriztem le.

Az analízis során kapott sejtszintű eredmények tartalmazzák az egyik vagy másik markerre pozitív, mindkét markerre pozitív, illetve negatív arányokat és sejtszámokat.



4. ábra: Bal oldal: képernyőkép az ImageXpress Pico kezelési felületéről, egy sárgán, egy zölden és egy pirosan expresszálo sejt látható; Jobb oldal: képernyőkép az ImageXpress Pico kezelési felületről, maszkolás beállítása

3.5. Sejtek mélyhűtése

A vizsgálat befejeztével a sejteket felszaporítottam 4-4 well-re, majd óvatos szuszpendálás után a sejteket egy-egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe helyeztem, majd 3 percig 1000 rpm-en centrifugáltam. A felülúszót leszívtam, ügyelve a pelletre, ezután újra szuszpendáltam a sejteket 250 µl madár-KO-DMEM-ben, majd a szuszpenziót feliratozott fagyasztócsövekbe helyeztem. A madár-KO-DMEM elkészítéséhez DMEM-et és streil H₂O-t használtam 2:1 arányban, ehhez hozzáadtam 4 µl nátrium piruvátot, és egy 0,22 µm-es filteren keresztül átszűrtem. A fagyasztó médium 5 ml madár-KO-DMEM-ből, 400 µl DMSO-ból és 7,5 µl CaCl₂-ből állt, amelyet filter segítségével szintén átszűrtem. Ebből 250 µl-t adtam lassú csepegtetéssel a sejtsuszpenzióhoz.

A csöveket egy fagyasztó dobozba tettem és -70°C -ra helyeztem 24 órára, majd áthelyeztem a -150°C -os mélyhűtő szekrénybe.

3.6. Adatelemzés

A CellReporterXpress programból kinyert adatokat Microsoft Excel táblázatkezelővel számoltam tovább. Az adatsorok rendezése után, az elemzéshez átlagokat és a hozzájuk tartozó szórás értékeket számoltam ki, valamint kétmintás t-próbát végeztem. T-próba esetén a szignifikancia szint $p < 0,05$ volt.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Proliferáció

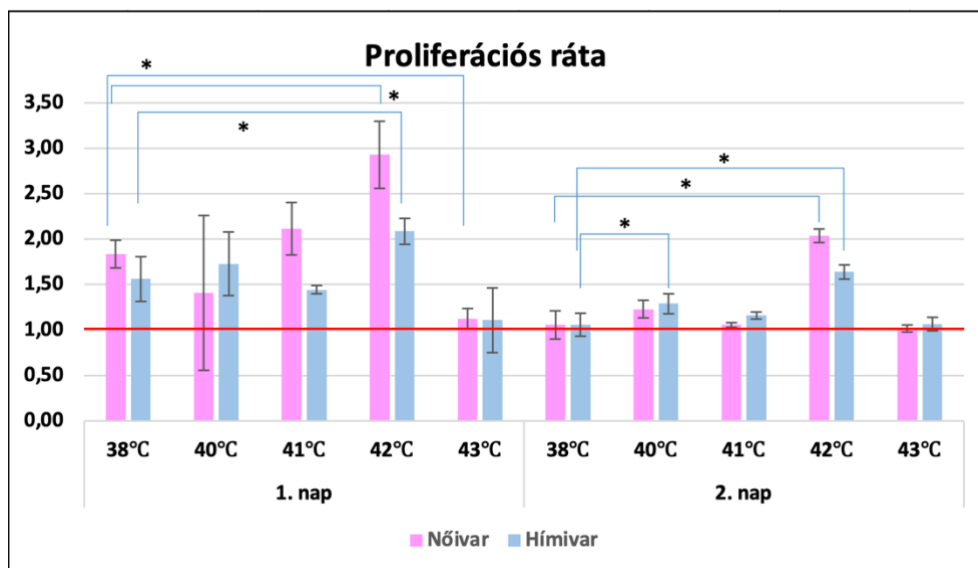
A proliferációs ráta kiértékelése során az első nap eredményét úgy kaptam meg, hogy a hőkezelés után 24 óra elteltével (T5) mért sejtszámot elosztottam a hőkezelés után (T1) mért sejtszámmal. A második nap eredményéhez a hőkezelés után 48 óra elteltével (T9) mért sejtszámot elosztottam a hőkezelés után 24 órával (T5) mért sejtszámmal. Amennyiben ez az érték >1 , a sejtszám nőtt az időpontok között. Ezt az értéket a diagramon piros vonallal jelöltem.

Az első és a második nap proliferációs rátájában különbség látható a kontroll, minden kezelési hőfok és ivar esetében is, ezt magyarázhatja a tenyésztőmédiumok tápanyagfogyása, mivel a médiumokat 2 naponta szükséges cserélni.

Az első napon a proliferációs ráta a legkisebb a 43°C-os hőkezelést követően hímivarnál volt (1,11), a legnagyobb a 42°C-os hőkezelést követően nőivarnál volt megfigyelhető (2,93). A második napon a legkisebb értékkel a 43°C-os hőkezelésen átesett nőivar rendelkezett (1,02), a legnagyobb értéke a 42°C-os hőkezelésen átesett nőivarnak volt (2,04). A 41°C-os és a 42°C-os hőkezelés hatására az ivarok az első 24 óra során különbözőképpen reagáltak, a nőivarban a sejtek intenzívebben osztódásnak indultak (41°C nőivar: 2,12, 42°C nőivar: 2,93, 41°C hímivar: 1,44, 42°C hímivar: 2,09). A 43°C-os hőkezelés hatására az első napon mindkét ivar sejtjeinek hasonló volt a proliferációs rátája (nőivar: 1,12, hímivar: 1,11), valamint a második napon a 42°C-os hőkezelés kivételével minden kezelési csoport esetében a két ivar értékeit összehasonlítva hasonló volt a proliferációs ráta (38°C nőivar: 1,06, hímivar: 1,06, 40°C nőivar 1,23, hímivar 1,29, 41°C nőivar 1,06, hímivar 1,16, 42°C nőivar: 2,04, 42°C hímivar: 1,64, 43°C nőivar 1,02, hímivar 1,07).

A legnagyobb szórás az első napon a 40°C-os hőkezelés esetében a nőivarnál, a legkisebb a második napon a 41°C-os hőkezelés után a nőivarban volt.

A hőkezelésen át nem esett (kontroll) csoporthoz képest az első napon szignifikáns eltérés figyelhető meg a proliferációs rátában mindkét ivarnál a 42°C-os és nőivarban a 43°C-os hőkezelést követően, a második napon a hímivarban a 40°C-os és mindkét ivarnál a 42°C-os hőkezelés hatására, ezeket a diagramon csillaggal jelöltem (1. diagram).



1. diagram: Proliferációs ráta

4.2. Sejtciklus változás a kezelések esetében

A T0 a hőkezelés előtti időpont Arthur készülékkel mérve, a T1 közvetlenül a hőkezelés utáni első mérés, a T2 6 órával a T1 időpont után következik, a T9 pedig 48 óra elteltével az utolsó időpont.

4.2.1. Kontroll csoport

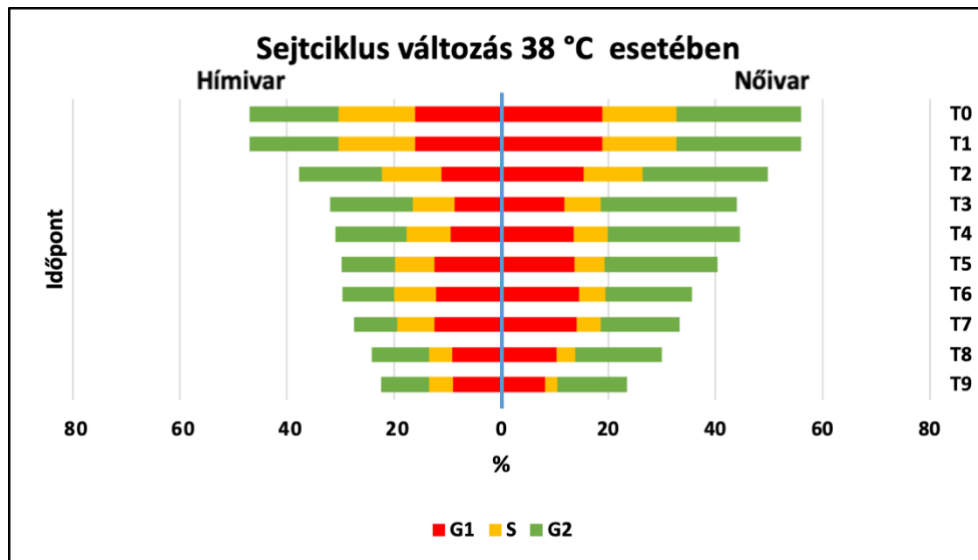
A kontroll csoport nem esett át hőkezelésen, 38°C-on voltak tárolva a megfigyelés ideje alatt.

A zölden és a pirosan expresszáló, G₂ és G₁ fázisú sejtek aránya a kontroll esetében az idő előrehaladtával csökkenő tendenciát mutatott mindkét ivarnál.

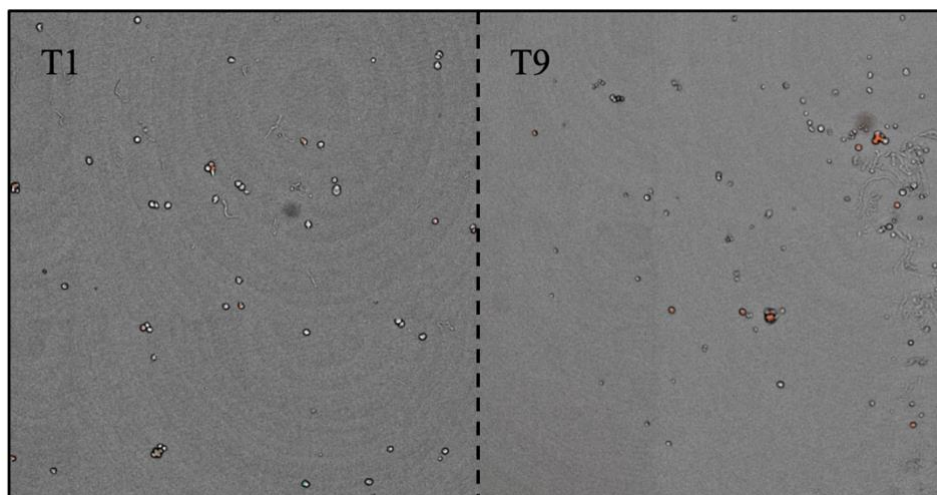
A sárgán expresszáló, S fázisú sejtek aránya is csökkenő tendenciát mutatott. Nőivar esetében nagyobb mértékű csökkenés figyelhető meg, mint a hímivarban (2. diagram).

A T1 és a T9 időpontban a nem (G₀) expresszáló sejtek arányának összehasonlítása során szignifikáns eltérés tapasztalható mindkét ivarnál, ezt a mellékletek fejezet 1., 2. diagramjain csillaggal jelöltem.

A D4-es well sejtei, azonos pozícióban az 5. ábrán láthatóak, bal oldalon a T1 időpontban, jobb oldalon a T9 időpontban.



2. diagram: Sejtciklus változás a kontroll csoportban



5. ábra: Bal oldal: A kontroll csoport sejtjei T1 időpontban; Jobb oldal: A kontroll csoport sejtjei T9 időpontban

4.2.2. 40°C-os hőkezelésen átesett csoport

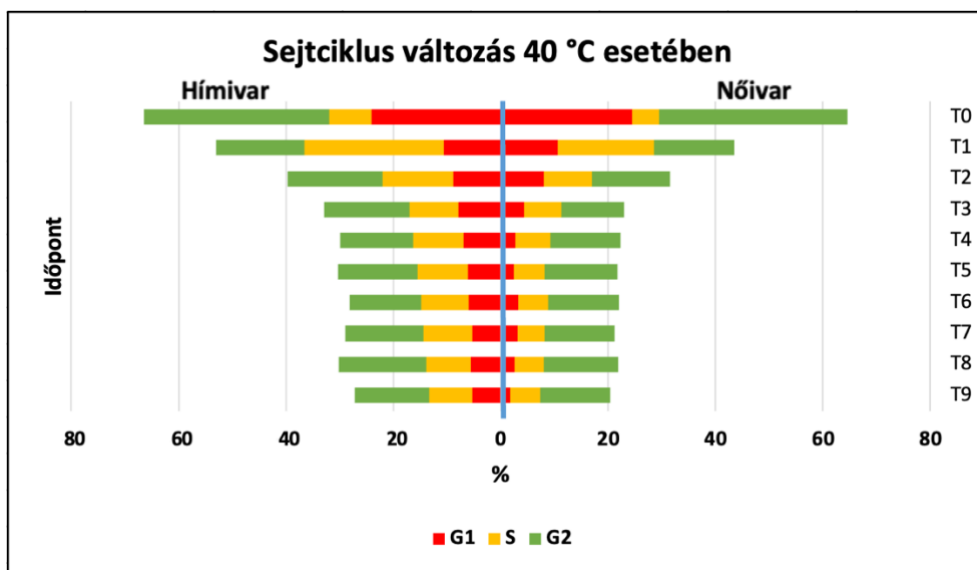
40°C-os hőkezelés hatására a zölden expresszáló, G₂ fázisú sejtek aránya feleződött T₀-ról T₁ időpontra, majd a további időpontokban nem volt nagy mértékű változás.

A pirosan expresszáló, G₁ fázisú sejtek aránya a hőkezelés hatására nagy mértékű csökkenő tendenciát mutatott, nőivarban a csökkenés mértéke nagyobb volt, mint a hímivarban.

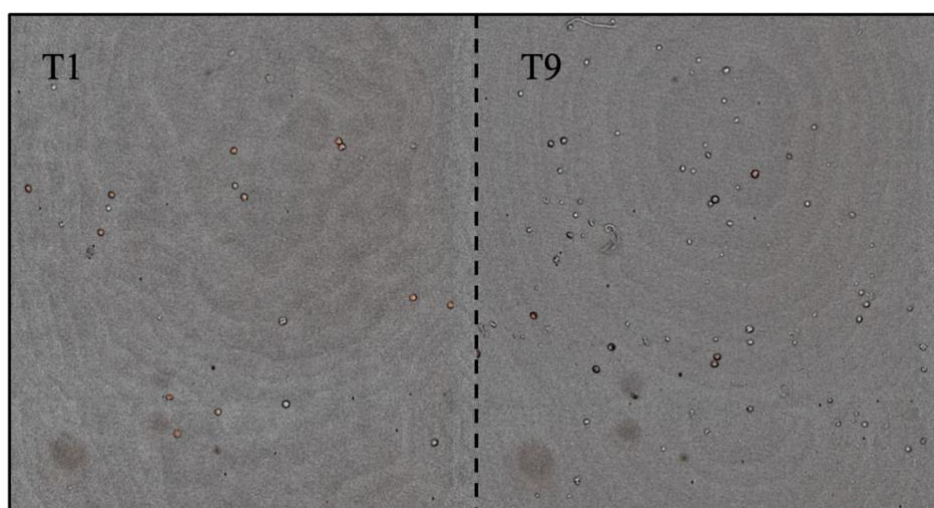
A sárgán expresszáló, S fázisú sejtek aránya nőtt a T₁ időpontban a T₀ időponthoz képest, majd T₂ időpontban feleződött, ez után a további időpontokban az arányuk nem változott, visszaállt a kiinduló értékhez közeli értékre (3. diagram).

A T1 és a T9 időpontok között a sejtek arányának változásában szignifikáns különbség van a pirosan (G₁), sárgán (S) és nem (G₀) expresszálo sejtek esetében nőivarban, ezek az adatok a mellékletek fejezet 3. és 4. diagramjain láthatóak, csillaggal jelöltem a statisztikai különbségeket.

A D5-ös well sejtei, azonos pozícióban a 6. ábrán láthatóak, bal oldalon a T1 időpontban, jobb oldalon a T9 időpontban.



3. diagram: Sejtciklus változása 40°C-os hőkezelés hatására



6. ábra: Bal oldal: A 40°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtei T1 időpontban; Jobb oldal: A 40°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtei T9 időpontban

4.2.3. 41°C-os hőkezelésen átesett csoport

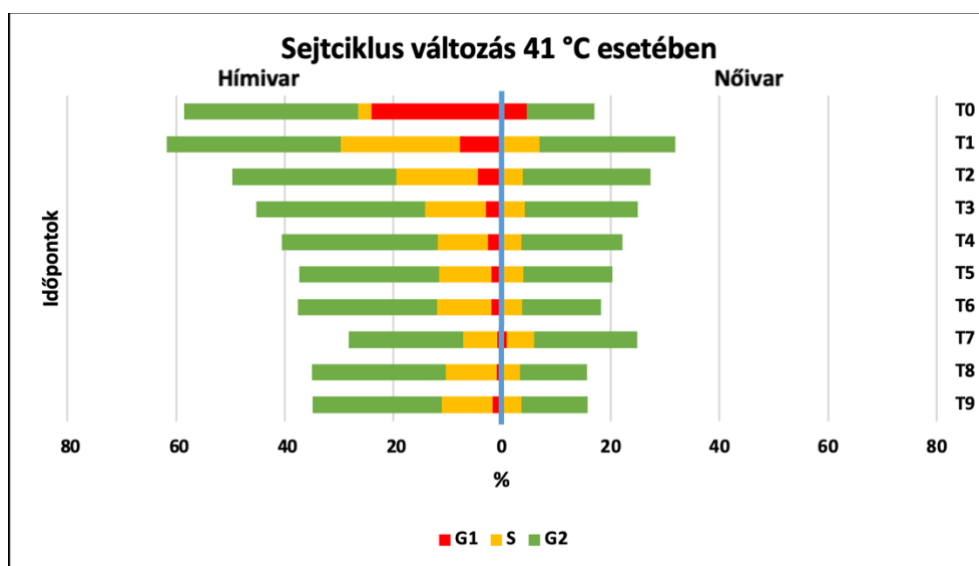
41°C-os hőkezelés hatására a zölden expresszáló, G₂ fázisú sejtek aránya T1 időpontban nőivar esetében megduplázódott a hőkezelés előtti időponthoz (T0) képest, hímivar esetében nem változott, majd csökkenő tendencia figyelhető meg mindkét ivar esetében. T9 időpontban a nőivarban a zölden (G₂) expresszáló sejtek aránya hasonló a hőkezelés előtti állapothoz. Mindkét ivar esetében a 41°C-os hőkezelés után a T7 időpontban megfigyelhető egy kiugró érték.

A pirosan (G₁) expresszáló sejtek aránya nagy mértékben lecsökkent a kezelés után. Nőivarban a T4, T8 és T9 időpontokban az arány 0 volt.

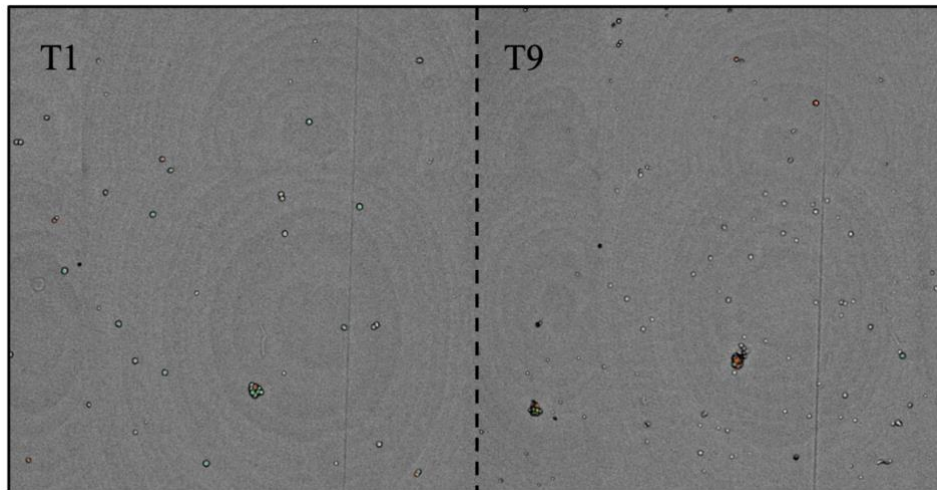
A sárgán expresszáló, S fázisú sejtek száma T1 időpontban nőtt T0 időponthoz képest, majd T2 időpontban lecsökkent, ezt követően az arányuk nem változott a T7 időpont kivételével, mivel ebben az időpontban nőivarban nőtt, hímivarban csökkent az arányuk, majd visszaállt az előtte lévő állapotba. A megfigyelési idő végére a hímivarban magasabb volt a sárgán (S) expresszáló sejtek aránya, mint a nőivarban (4. diagram).

A pirosan (G₁) és a sárgán (S) expresszáló sejtek esetében a T1 és T9 időpontokat összehasonlítva a sejtek arányában szignifikáns eltérés van hímivarnál, a nem (G₀) expresszáló sejtek esetében pedig mindkét ivarnál, ezeket a különbségeket a mellékletek fejezet 5., 6. diagramjain csillaggal jelöltem.

A D8-as well sejtjei, azonos pozícióban a 7. ábrán láthatóak, bal oldalon a T1 időpontban, jobb oldalon a T9 időpontban.



4. diagram: Sejtciklus változása 41°C-os hőkezelés hatására



7. ábra: Bal oldal: A 41°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T1 időpontban; Jobb oldal: A 41°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T9 időpontban

4.2.4. 42°C-os hőkezelésen átesett csoport

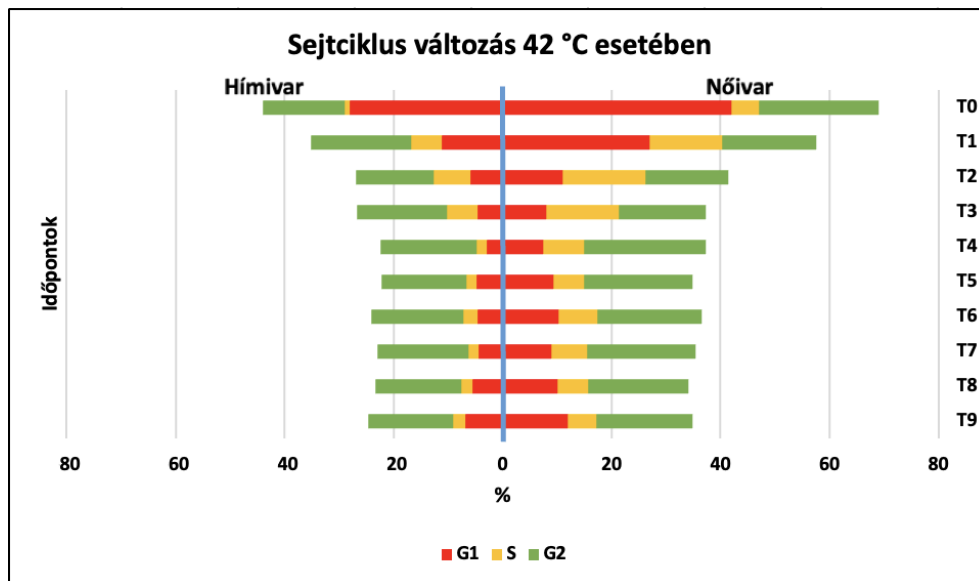
A 42°C-os hőkezelés hatására a zölden (G₂) expresszáló sejtek aránya a nőivarban csökkent a T1 időpontban a T0 időponthoz képest, majd a sejtek arányának változásában számottevő eltérés nem következett be a későbbi időpontokban. T9 időpontban a sejtek aránya 17,715% volt, amely közelít a T1-es értékhez (17,275%). A hímivarban a T1 időpontban a sejtek aránya nőtt a T0 időponthoz képest.

A pirosan expresszáló, G₁ fázisú sejtek esetében az arány, a megfigyelési idő során a T4 időpontig csökkent mindkét ivar esetében, majd enyhén növekvő tendencia figyelhető meg a sejtek arányát összehasonlítva a T5 és T9 időpontokban (nőivarban T5: 9,42%, T9: 11,89%, hímivarban T5: 4,7175%, T9: 6,8425%).

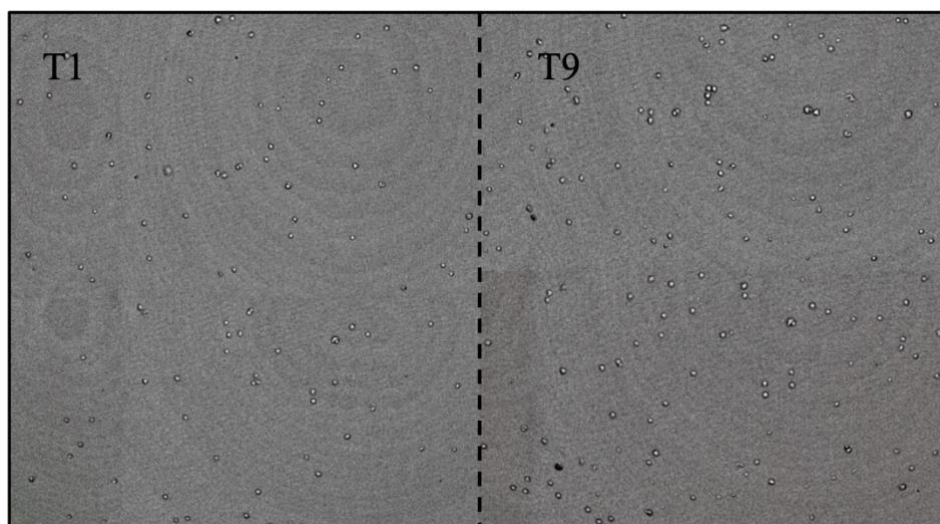
A sárgán expresszáló, S fázisú sejtek aránya a hőkezelés hatására nőtt mindkét ivarban a T2 időpontig, majd T3 időpont után csökkenő tendencia figyelhető meg nőivarban a T5, hímivarban a T4 időpontig, a többi időpontban csak enyhe változás volt tapasztalható (5. diagram).

A T1 és T9 időpontok összehasonlítása esetén szignifikáns eltérés található mindkét ivarnál, a statisztikai különbségek a mellékletek fejezet 7., 8. diagramokon csillaggal jelölve láthatóak.

A D4-es well sejtjei, azonos pozícióban a 8. ábrán láthatóak, bal oldalon a T1 időpontban, jobb oldalon a T9 időpontban.



5. diagram: Sejtciklus változása 42°C-os hőkezelés hatására



8. ábra: Bal oldal: A 42°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T1 időpontban; Jobb oldal: A 42°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T9 időpontban

4.2.5. 43°C-os hőkezelésen átesett csoport

43°C -os hőkezelés hatására a zölden (G₂) expresszáló sejtek aránya csökkent. Az arányuk a T9 időpontban 6% alatt volt mindkét ivar esetében.

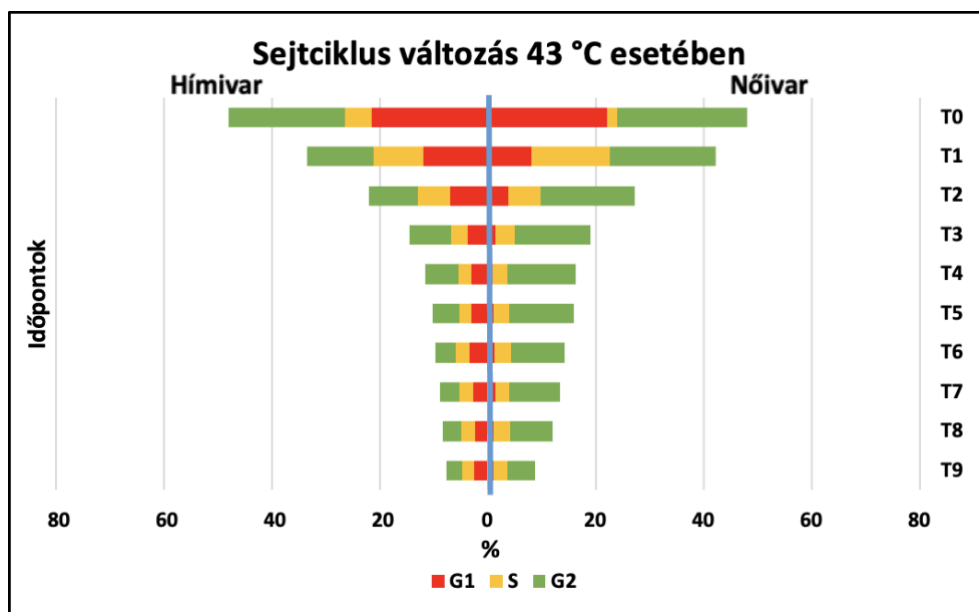
A pirosan expresszáló, G₁ fázisú sejtek esetében is csökkenő tendencia figyelhető meg, a T1 időpontban az arányuk feleződött a T0 időponthoz képest.

A T1 időpontban a sárgán expresszáló, S fázisú sejtek aránya nőtt, majd T2 időpontban csökkent, ez után az arány változásában nagy eltérés nem figyelhető meg (6. diagram).

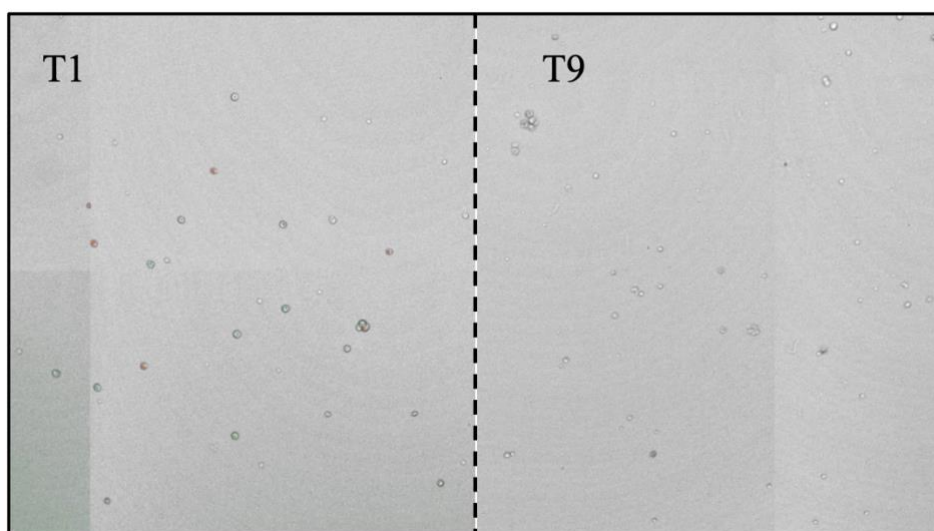
A T9 időpontban az aktív sejtek közül mindkét ivarban megtalálhatóak zölden (G₂), pirosan (G₁) és sárgán (S) expresszáló sejtek is.

A T1 és T9 időpont összehasonlítása során szignifikáns eltérés található a sejtek arányának változásában a zölden (G₂) expresszáló sejtek esetén nőivarnál, a pirosan (G₁), sárgán (S) és nem (G₀) expresszáló sejtek esetében pedig mindkét ivarnál, ezeket a mellékletek fejezet 9., 10. diagramjain csillaggal jelöltem.

A D4-es well sejtjei, azonos pozícióban a 9. ábrán láthatóak, bal oldalon a T1 időpontban, jobb oldalon a T9 időpontban.



6. diagram: Sejtciklus változása 43°C-os hőkezelés hatására



9. ábra: Bal oldal: A 43°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T1 időpontban; Jobb oldal: A 43°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T9 időpontban

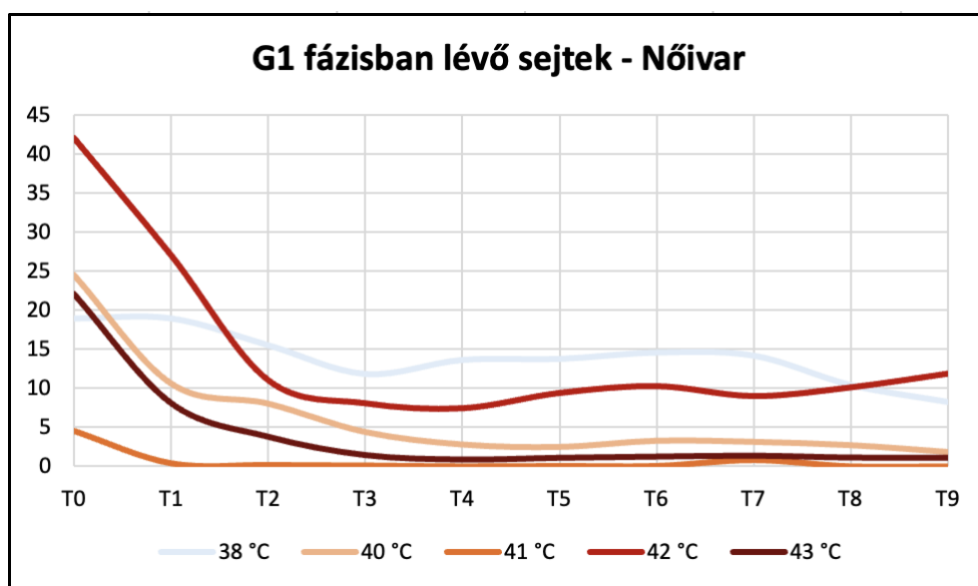
4.3. Sejtmarker változás

4.3.1. G₁ sejtfázisban lévő, piros jelet expresszáló sejtek

A pirosan expresszáló, G₁ fázisú sejtek esetében mindkét ivarban a kontroll csoportnál ciklikusság figyelhető meg, ezt viszont már a 40°C-os hőkezelés is befolyásolja, ciklikusság a hőkezelési csoportoknál nem látható.

Nőivar esetében a hőkezelés hatására a pirosan (G₁) expresszáló sejtek aránya nagyobb mértékben csökkent, mint a kontroll csoport. A 41°C hőkezelést követően a megfigyelési idő alatt az aránya nem volt magasabb 1%-nál. A 43°C-os hőkezelés után pedig a T3 időpontot követően az aránya nem volt magasabb 2%-nál.

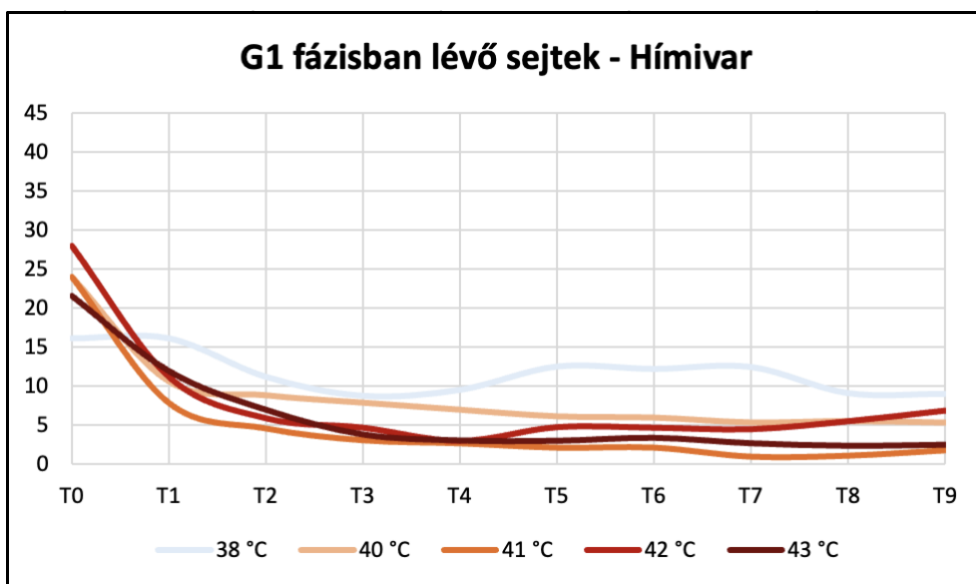
Azonban a 42°C-os kezelés esetében a G₁ fázisú sejtek változása T2 után alacsonyabb aránnyal, de hasonló mértékben változott, mint a kontroll csoport. T9-re pedig 11,89%-ra emelkedett (9. diagram).



9. diagram: Pirosan expresszáló sejtek változása nőivarban

Hímivar esetében szintén csökkenő tendencia figyelhető meg a hőkezelések után, viszont kisebb mértékű, mint a nőivar esetében. A hőkezelést követően a sejtek aránya hasonló volt a T1 időpontban (legkisebb: 7,775% (41°C), legnagyobb: 11,895% (43°C)). A hőkezelés után T3 időpontot követően a 41°C-os hőkezelési csoport esetében 3% alattiak az értékek, a 43°C-os hőkezelési csoportnál pedig 4% alattiak. T9 időpontra a 40°C-os és a 42°C-os csoport

értékeinek aránya között nem volt nagy a különbség. A 42°C-os csoport csak értéke 2,155 %-kal volt alacsonyabb, mint a kontroll csoport értéke (10. diagram).

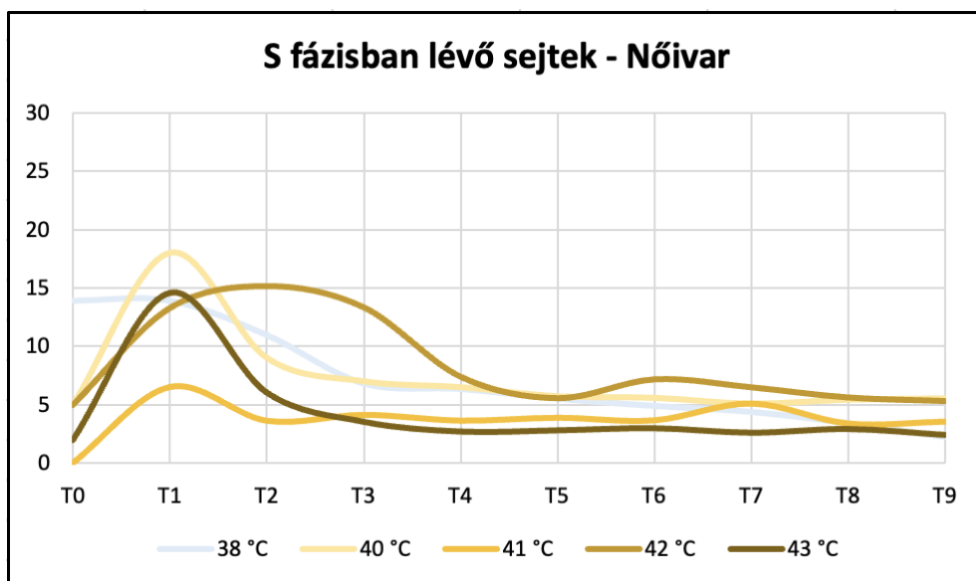


10. diagram: Pirosan expresszáló sejtek változása hímivarban

4.3.2. Mindkét markerre pozitív (S, sárga) sejtek

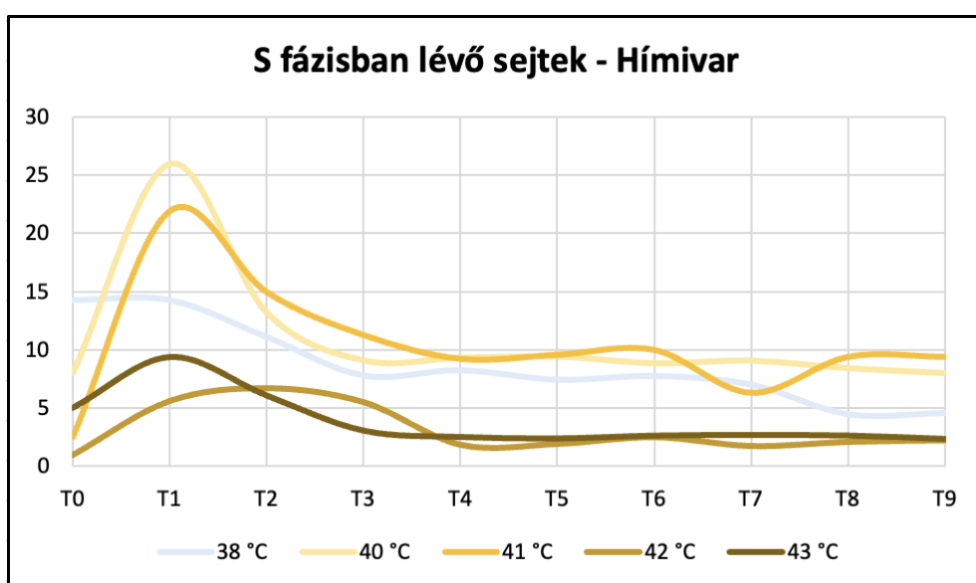
A mindkét markerre pozitív, S fázisú, sárga jelet expresszáló sejtek esetében a hőkezelés hatására, valamennyi kísérleti csoportban T1 időpontban megnőtt a sejtek aránya, majd T2 időpontban a felére csökkent, az ezt követő időpontokban pedig enyhén csökkent vagy stagnált. A 42°C-os hőkezelési csoport esetében a nagyobb mértékű csökkenés csak a T4 időpont után volt észlelhető. A kontroll csoport esetében is csökkenés volt megfigyelhető T1–T3 időpontok között.

Nőivar esetében a 40°C-os hőkezelési csoport értékei hasonlóak voltak a kontroll csoportéhoz T3 és T7 időpontok között (11. diagram).



11. diagram: Mindkét markerre pozitív sejtek változása nőivarban

A hímivarban mért eredmények hasonlítanak a nőivarú csoportok eredményeihez. Valamennyi csoportban a sejtek aránya kezdeti növekedést, majd T1 időpont után csökkenést mutatott. A 42°C-os csoport esetében az emelkedés időben tovább tartott, a nőivarhoz hasonlóan. A 40°C-os hőkezelési csoport értékei hasonlóak voltak a 41°C-os hőkezelési csoportéhoz, a 42°C-os hőkezelési csoport értékei pedig a 43°C-os hőkezelési csoportéhoz (12. diagram).

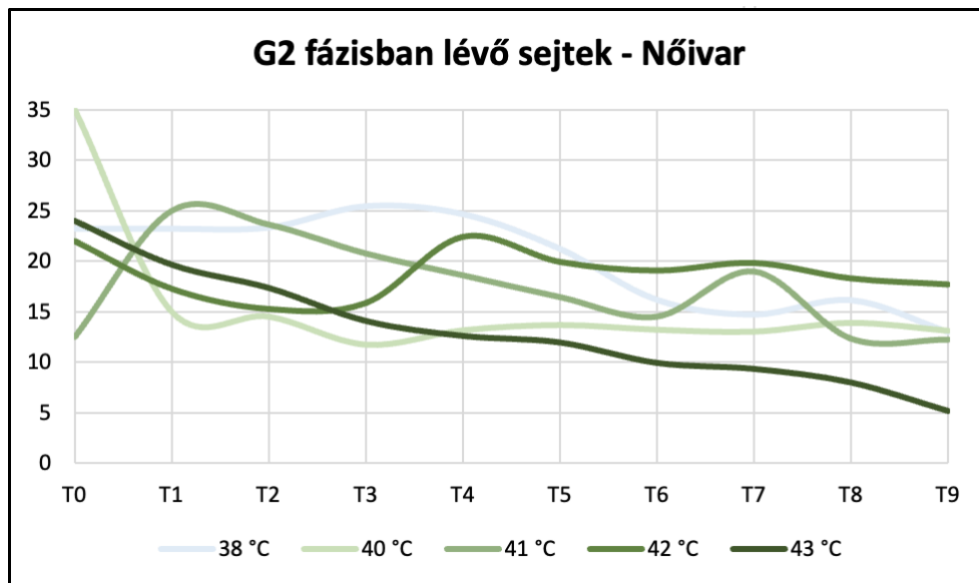


12. diagram: Mindkét markerre pozitív sejtek változása hímivarban

4.3.3. G₂ sejtfázisban lévő, zölden expresszáló sejtek

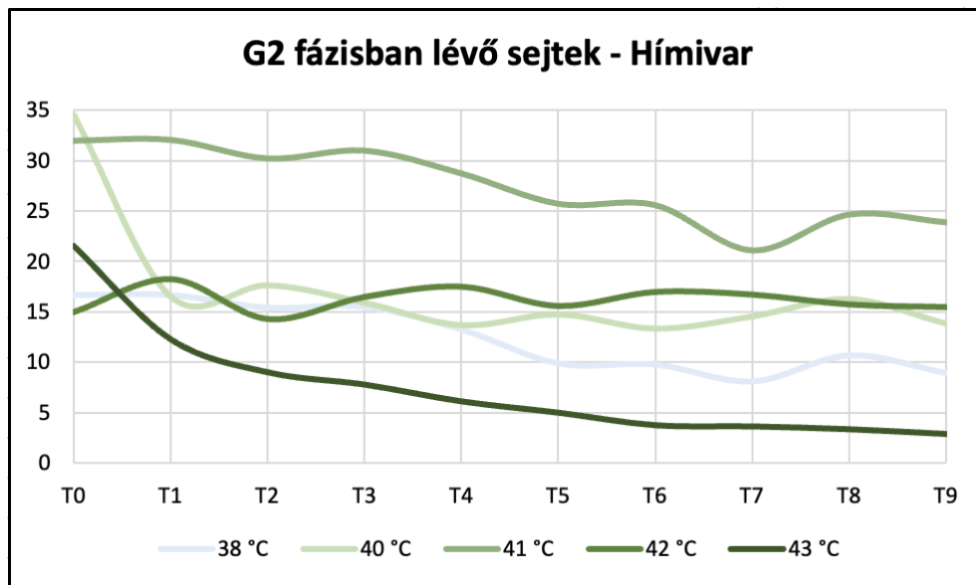
A G₂ sejtfázisú, zölden expresszáló sejtek esetében mindkét ivarban a kontroll csoportnál ciklikusság figyelhető meg, ezt viszont már a 40°C-os hőkezelés is befolyásolja. Ez a ciklikusság a hőkezelt csoportoknál nem látható, a kontroll csoportnál megfigyelt formában.

Nőivarban a különböző kezelési hőfokok esetében a hőkezelés előtt (T0) különböző volt a G₂ fázisú sejtek aránya, viszont a hőkezelés után T1 időpontban hasonló értéket vett fel (legkisebb: 14,9275% (40°C), legnagyobb: 24,96% (41°C)). A 40°C-os hőkezelést követően a G₂ fázisú sejtek aránya nagyban lecsökkent a T1 időpontra a T0 időponthoz képest (T0: 35, T1: 14,9275), utána stagnált. A 41°C-os hőkezelést követően pedig kezdeti növekedés (T0: 12,5, T1: 24,96), majd csökkenés volt megfigyelhető. A 42°C-os hőkezelés után T3-ig csökkent a G₂ fázisú sejtek aránya, majd növekedés és stagnálás volt megfigyelhető. A 43°C-os hőkezelés hatására a sejtek aránya csökkenő tendenciát mutatott a megfigyelési idő alatt (7. diagram).



7. diagram: Zölden expresszáló sejtek változása nőivarban

Hímivar esetében a 40°C-os hőkezelést követően a G₂ fázisú sejtek aránya nagyban lecsökkent a T1 időpontra a T0 időponthoz képest. A 41°C-os hőkezelés esetén csökkenő tendencia látható. A 42°C-os hőkezelés hatására a sejtek aránya megnövekedett a T1 időpontra a T0 időponthoz képest, majd a T2 időpontra csökkent, ezt követően a megfigyelési idő hátralévő részében hasonló értékeket vett fel. A 43°C-os hőkezelés hatására a sejtek aránya csökkenő tendenciát mutatott a megfigyelési idő alatt (8. diagram).



8. diagram: Zölden expresszáló sejtek változása hímivarban

5. Következtetések és javaslatok

A teljes vizsgálati időszakban, minden csoportot figyelembe véve jól látható, hogy az egyes hőkezelések milyen hatással voltak a proliferációra, a kiindulási állapotokra, valamint a kezelést követő 48 órában a sejtciklusokban milyen eltérések keletkeztek az adott csoportban az ivarok között és a csoportok között a kontrollhoz viszonyítva.

Az eredmények alapján a sejtekre negatív hatással van egy rövid idejű hőkezelés, már 40°C esetében is, az egyre magasabb hőmérsékletű kezeléseket a sejtek kevésbé tolerálják. Kiemelendő, hogy a 42 °C-s kezelés egyedi eredményt mutatott az S és G₂ fázis változásában. Általánosságban a hímivarú sejtek jobb arányban expresszáltak fluorescens jelent a nőivarhoz képest.

A teljes vizsgálati időszakban az egyes markereket egymáshoz viszonyítva jól megfigyelhető, hogy a sejtciklus egyes fázisainak aránya és ezek időbeli változása milyen mértékben tér el a kontrollhoz viszonyítva.

A normál sejtműködésre jellemző ciklikusság érzékelhető a kontroll csoport esetében, amiben már a 40°C -os hőkezelés is eltérést okoz.

A vizsgálati eredmények alapján elmondható, hogy a választott modellrendszerrel megfelelően vizsgálható a sejtciklus változása, megfigyelhetők az eltérések külső stressz hatására. Az eredményekből levonható következtetések reálisnak tekinthetők, a változások jól nyomon követhetők, vizsgálhatóak az ivari különbségek.

A továbbiakban szeretném elvégezni a hőkezelés során történő változások megfigyelését *time-lapse* felvételek készítésével és analízisével, ami fontos kiegészítése lehet a vizsgálatnak. Az eredmények pontosíthatók lehetnek a sejtszám növelésével, a technikai körülmények finomhangolásával, valamint további adatok statisztikai elemzésével.

Az eredményeim segíthetnek megállapítani az optimális paramétereket a további hőadaptációs kísérleteinkhez.

6. Összefoglalás

Az ősvarsejt (PGC) az egyetlen olyan sejttípus, amely képes egy élőlény teljes genetikai információját átadni a következő generáció számára. A többsejtes szervezetek érett ivarsejtjei, a hímivarsejt és a petesejt, az ősvarsejtekből fejlődnek ki. Az ősvarsejtek az embrionális fejlődés korai szakaszától kezdve jól megkülönböztethetők a szomatikus sejtektől. A házityúk esetében az embrionális vérből könnyen izolálhatóak, majd homogén *in vitro* sejtenyészetek alapítása után felhasználhatók génmegőrzésre, illetve a sejtosztódás mechanizmusának tanulmányozására is.

A kísérletben Ecker András által alapított, a FUCCI vektort stabilan integrálódva tartalmazó házityúk ősvarsejt vonalakkal dolgoztam. A FUCCI (fluorescens ubikvitináció alapuló sejt ciklus indikátor) riporter génről, a sejtciklus fázisainak megfelelően, periodikusan váltakozva expresszál egy speciális zöld (G₂), illetve egy piros (G₁) fluoreszcens fehérje.

Két sejtvonallal dolgoztam, ezeket felolvasztás után négy hétig tenyésztettem, majd sejtszámlálás után végeztem el a hőkezelést.

Vizsgálataim során a magyar őshonos házityúk ősvarsejtjein hőkezelést végeztem 40°C, 41°C, 42°C, 43°C-on, majd megfigyeltem a hőkezelés hatására fellépő sejtciklus változást. A vizsgálat befejeztével a sejteket mélyhűtöttem.

A hőkezelés utáni vizsgálat során összegyűjtött adatokat kiértékeltem.

Az eredmények kiértékelése során kiszámoltam a proliferációs rátát, ami a sejtszám növekedését mutatta 24 óra leforgása alatt. Ez után megvizsgáltam a sejtciklus változását kezelési csoportonként, majd a különböző markerek változását a hőkezelés hatására.

A FUCCI PGC modellrendszert sikeresen alkalmaztuk, az eredmények hasznos információval szolgálnak további, a FUCCI-t expresszáló ősvarsejt tenyészeteken alapuló vizsgálati módszerek kidolgozásához. A vizsgálataim eredménye alapján elmondható, hogy a hőkondicionálás hatására a sejtciklusban bekövetkező változások pontosan detektálhatók. Az eredményeimből jól látható, hogy nem csak maga a hőkezelés, de a kezelt tenyészetek ivara is befolyásolja a sejtciklus fázisainak alakulását. Összességében megállapítható, hogy eredményeim segíthetnek az optimális kezelési paraméterek beállításában a további hőadaptációs kísérleteinkben.

7. Irodalomjegyzék

- Abdulhassan M., Ruden X., Marben T., Harris S., Ruden D. M., Awonuga A. O., & Puscheck E. E. (2022). Using Live Imaging and Fluorescence Ubiquitinated Cell Cycle Indicator Embryonic Stem Cells to Distinguish G1 Cell Cycle Delays for General Stressors like Perfluoro-Octanoic Acid and Hyperosmotic Sorbitol or G2 Cell Cycle Delay for Mutagenic Stressors like Benzo(a)pyrene. *Stem Cells Dev*, 31, 296–310.
- Alexander A., Graham J., Hammerstedt R. H., & Barbato G. F. (1993). Effects of genotype and cryopreservation of avian semen on fertility and number of perivitelline spermatozoa. *British Poultry Science*, 34, 757–764.
- Aramaki S., Kubota K., Soh T., Yamauchi N., & Hattori M. (2009). Chicken dead end homologue protein is a nucleoprotein of germ cells including primordial germ cells. *J. Reprod. Dev*, 55, 214–218.
- Aramaki S., Sato F., Kato T., Soh T., Kato Y., & Hattori M. (2007). Molecular cloning and expression of dead end homologue in chicken primordial germ cells. *Cell Tissue Res*, 330, 45–52.
- Báldy B. (1954). A baromfi tenyésztése. In *Á. Mezőgazdasági Kiadó*.
- Barna J., Végi B., Váradi É., & Liptói K. (2010). Comparative study on cryopreservation procedures of gander sperm. *World Poultry Science Journal*, 66, 508.
- Bódi L., Thieu Ngoc Lan Phuong, Kovácsné Gaál K., Konrád Sz., Barta I., Kisné Do thi Dong Xuan, Szentes K. Á., Szalay I., & Lencsés Gy. (2015). A tojások fizikai minőségének összehasonlító vizsgálata különböző típusú tyúkállományokban. *Animal Welfare, Etológia És Tartástechnológia*, 11, 70–77.
- Chalah, T., Seigneurin, F., Blesbois, E., & Brillard, J. P. (1999). In Vitro Comparison of Fowl Sperm Viability in Ejaculates Frozen by Three Different Techniques and Relationship with Subsequent Fertility in Vivo. *Cryobiology*, 39(2), 185–191. <https://doi.org/10.1006/CRYO.1999.2201>
- Clawson R. C., & Domm L. V. (1969). Origin and early migration of primordial germ cells in the chick embryo: a study of the stages definitive primitive streak through eight somites. *Am. J. Anat*, 125, 87–111.
- Das R., Sailo L., Verma N., Bharti P., Saikia J., Imtiwati, & Kumar R. (2016). Impact of heat stress on health and performance of dairy animals: A review. *Vet World*, 9, 260–268.
- Didier E., Didier P., Fargeix N., Gulliot J., & Thiery J. P. (1990). Expression and distribution of carbohydrate sequences in chick germ cells: a comparative study with lectins and the NC-1/HNK-1 monoclonal antibody. *Int. J. Dev. Biol*, 34, 421–431.
- Dong Xuan K. D. T., Lan Phuong T. N., Tien P. D., Thu P. T. M., Khiem N. Q., Nhung D. T., Muoi N. T., Oanh N. T. K., Thanh P. T. K., & Szalay I. T. (2017). In situ and ex situ assessment of a native Hungarian chicken breed for its potential conservation and adaptation in the subtropics. *Animal Production Science*, 57, 975–980.
- Dubos F., Seigneurin F., Mialon-Richard M. M., Grasseau I., Guy G., & Blesbois E. (2006). *Cryopreservation of Landese gander semen*. Symposium COA/INRA Scientific Cooperation in Agriculture.
- Ecker, A., Lázár, B., Tóth, R. I., Urbán, M., Hoffman O., Fekete Z., Barta E., Uher F., Matula Z., Várkonyi, E., & Góczy, E. (2024). Creating a novel method for chicken primordial germ cell health monitoring using the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator reporter system. *Poultry Science*, 10(103), 104–144. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2024.104144>
- Eyal-Giladi H., Ginsburg M., & Farbarov A. (1981). Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *J. Embryol. Exp. Morphol*, 65, 139–147.
- Eyal-Giladi H., & 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. *Dev. Biol*, 49, 321–337.
- Garner, D. L., & Seidel, G. E. (2008). History of commercializing sexed semen for cattle. *Theriogenology*, 69(7), 886–895. <https://doi.org/10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2008.01.006>
- Ginsburg M., & Eyal-Giladi H. (1986). Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol*, 95, 53–71.
- Godde, C. M., Mason-D'Croz, D., Mayberry, D. E., Thornton, P. K., & Herrero, M. (2021). Impacts of climate change on the livestock food supply chain; a review of the evidence. *Global Food Security*, 28, 100488. <https://doi.org/10.1016/J.GFS.2020.100488>
- Hamburger V., & Hamilton H. L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol*, 88, 49–92.
- Hamburger V., & Hamilton H. L. (1992). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn*, 195, 231–272.
- Hammerstedt, R. H., & Graham, J. K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology*, 29(1), 26–38. [https://doi.org/10.1016/0011-2240\(92\)90004-L](https://doi.org/10.1016/0011-2240(92)90004-L)
- Hayashi, J. I., Tagashira, Y., & Yoshida, M. C. (1985). Absence of extensive recombination between inter- and intraspecies mitochondrial DNA in mammalian cells. *Experimental Cell Research*, 160(2), 387–395. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(85\)90185-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(85)90185-5)
- Hoffman I. (2010). Climate change and the characterization, breeding and conservation of animal genetic resources. *Animal Genetics*, 41, 32–46.
- Holt W. V. (1997). Alternative strategies for long-term preservation of spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*, 9, 309–319.
- Intarapat, S., & Stern, C. D. (2014). Left-right asymmetry in chicken embryonic gonads. In *Journal of Poultry Science* (Vol. 51, Issue 4, pp. 352–358). Japan Poultry Science Association. <https://doi.org/10.2141/jpsa.0140032>
- Israels, E. D., & Israels, L. G. (2000). The Cell Cycle. *The Oncologist*, 5(6), 510–513. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.5-6-510>

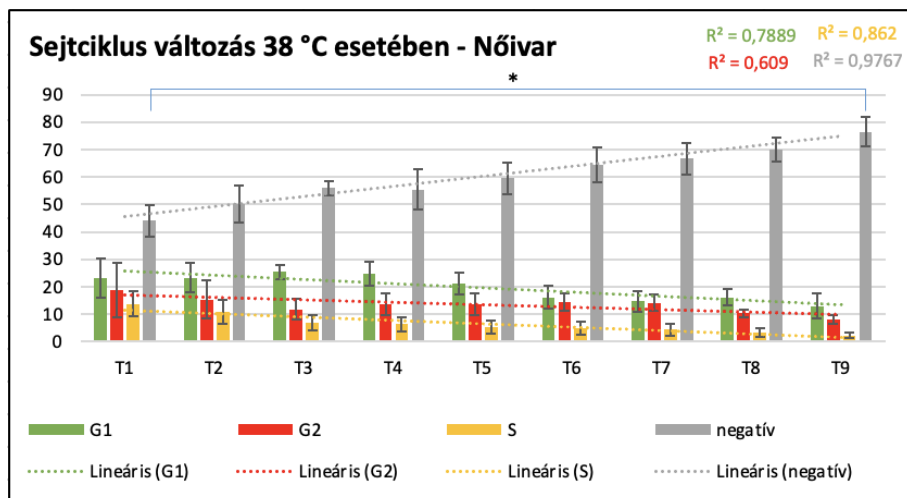
- Kang K. S., Lee C. H., Kim H. J., Lee H. G., Kim Y. M., Lee H. J., Park Y. H., Yang S. Y., Rengaraj D., Park T. S., & Han J. Y. (2015). Spatial and temporal action of chicken primordial germ cells during initial migration. *Reproduction*, 149, 179–187.
- Kim, Y. M., & Han, J. Y. (2018). The early development of germ cells in chicken. *International Journal of Developmental Biology*, 62(1–3), 141–148. <https://doi.org/10.1387/ijdb.170283jh>
- Kito G., Aramaki S., Tanaka K., Soh T., Yamauchi N., & Hattori M. (2010). Temporal and spatial differential expression of chicken germline-specific proteins cDAZL, CDH and CVH during gametogenesis. *J. Reprod. Dev.*, 56, 341–346.
- Koh S. B., Mascalachi P., Rodriguez E., Lin Y., Jodrell D. I., Richards F. M., & Lyons S. K. (2017). A quantitative FastFUCCI assay defines cell cycle dynamics at a single-cell level. *J. Cell Sci.*, 130, 512–520.
- KSH. (2025). *Magyar statisztikai évkönyv 2024*. KSH. <https://www.ksh.hu>
- Lake P. E., & Stewart J. M. (1978). Preservation of fowl semen in liquid nitrogen - an improved method. *British Poultry Science*, 19, 187–194.
- Lan Phuong T. N., Barta I., Bódi L., Dong Xuan K. D. T., Kovács J. N., Ferencz T. R., & Szalay I. T. (2014). Egg production profiles of seven traditional Hungarian chicken breeds. *European Poultry Science*, 78, 69.
- Lara, L. J., & Rostagno, M. H. (2013). Impact of heat stress on poultry production. In *Animals* (Vol. 3, Issue 2, pp. 356–369). <https://doi.org/10.3390/ani3020356>
- Lázár B., Tokodyné Szabadi N., Tóth R., Ecker A., Urbán M., Várkonyi E., Liptói K., & Gócza E. (2023). A napos kori hőkezelés transzgenerációs hatásainak vizsgálata háziutyukban. *Állattenyésztés És Takarmányozás*, 72 (3), 220–230.
- Lee H. C., Choi H.J., Lee H. G., Lim J. M., Ono T., & Han J.Y. (2016). DAZL Expression Explains Origin and Central Formation of Primordial Germ Cells in Chickens. *Stem Cells Dev.*, 25, 68–79.
- Liptói K., & Váradi É. (2017). Génmegőrzés ivarszervszövet-átültetés segítségével. In *Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében*.
- Liu C., Chang I. K., Khazanehdari K. A., Thomas S., Varghese P., Baskar V., Alkhatib R., Li W., & Wernery U. (2017). Uniparental chicken offsprings derived from oogenesis of chicken primordial germ cells (ZZ). *Biology of Reproduction*, 96 (3), 686–693.
- Lukaszewicz, E., Chrzanowska, M., Jerysz, A., & Chelmońska, B. (2004). Attempts on freezing the Greylag (Anser anser L.) gander semen. *Animal Reproduction Science*, 80(1–2), 163–173. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00119-2](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00119-2)
- Mariat, D., & Vergnaud, G. (1992). Detection of polymorphic loci in complex genomes with synthetic tandem repeats. *Genomics*, 12(3), 454–458. [https://doi.org/10.1016/0888-7543\(92\)90434-T](https://doi.org/10.1016/0888-7543(92)90434-T)
- Mendez C., Carrasco E., & Pedemera E. (2005). Adenohypophysis regulates cell proliferation in the gonads of the developing chick embryo. *J. Exp. Zool. A. Comp. Exp. Biol.*, 303, 179–185.
- Meyer D. B. (1960). Application of the periodic acid-schiff technique to whole chick embryos. *Stain Tech*, 35, 83–89.
- Meyer D. B. (1964). The Migration of Primordial Germ Cells in the Chick Embryo. *Dev. Biol.*, 10, 154–190.
- Molyneaux, K., & Wylie, C. (2004). Primordial germ cell migration. In *Int. J. Dev. Biol* (Vol. 48). www.ijdb.ehu.es
- Naito M. (2003). Cryopreservation of avian germline cells and subsequent production of viable offspring. *The Journal of Poultry Science*, 40, 1–12.
- Naito M., Matsubara Y., Harumi T., Tagami T., Kagami H., Sakurai M., & Kuwana T. (1999). Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *Journal of Reproduction and Fertility*, 117, 291–298.
- Nakamaya K. I., & Nakamaya K. (2006). Ubiquitin ligases: Cell-cycle control and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 6, 369–381.
- Nakamura Y., Yamamoto Y., Usui F., Mushika T., Ono T., Setioko A. R., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., & Tagami T. (2007). Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult. Sci.*, 86, 2182–2193.
- Nieuwkoop P. D., & Sutasurya L. A. (1979). Primordial germ cells in the chordates: embryogenesis and phylogenesis. *Cambridge University Press*, 113.
- Nussbaum M. (1880). Zur Differenzierung des Geschlechts im Tierreich. *Arch. Mikrosk. Ant.*, 18.
- Pálkás-Bodzsár N., & Hidas A. (2017). Fajtavédelem és génmegőrzés molekuláris genetikai paraméterekkel. In *Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében* (pp. 81–91).
- Patakiné Várkonyi E., Gócza E., & Lázár B. (2017). Génmegőrzés embrionális sejtek segítségével. In *Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében* (pp. 64–80).
- Petitte, J. N. (2006). Avian Germplasm Preservation: Embryonic Stem Cells or Primordial Germ Cells? *Poultry Science*, 85(2), 237–242. <https://doi.org/10.1093/PS/85.2.237>
- Pfeiffer, J., Tarbashevich, K., Bandemer, J., Palm, T., & Raz, E. (2018). Rapid progression through the cell cycle ensures efficient migration of primordial germ cells – The role of Hsp90. *Developmental Biology*, 436(2), 84–93. <https://doi.org/10.1016/J.YDBIO.2018.02.014>
- Prasedya E. S., Miyake M., Kobayashi D., & Hazama A. (2016). Carrageenan delays cell cycle progression in human cancer cells in vitro demonstrated by FUCCI imaging. *BMC Complement. Altern. Med.*, 16.
- Rojas-Downing M. M., Nejadhashemi A. P., Harrigan T., & Woznicki S. A. (2017). Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation. *Clim. Risk. Manag.*, 16, 145–163.
- Romanoff A. L. (1960). The avian embryo: structural and functional development. *Macmillan*, 783–862.
- Sakaue-Sawano A. H., Kurokawa T., Morimura A., Hanyu H., Hama H., Osawa S., Kashiwagi K., Fukami T., Miyata H., Miyoshi T., Imamura M., Ogawa H., Masai H., & Miyawaki A. (2008). Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell*, 132, 487–498.
- Soleimani, A. F., Zulkifli, I., Omar, A. R., & Raha, A. R. (2011). Physiological responses of 3 chicken breeds to acute heat stress. *Poultry Science*, 90(7), 1435–1440. <https://doi.org/10.3382/PS.2011-01381>
- Stebler J., Spieler D., Slanchev K., Molyneaux K. A., Richter U., Cojocar V., Tarabykin V., Wylie C., Kessel M., & Raz E. (2004). Primordial germ cell migration in the chicken and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Dev. Biol.*, 272, 351–361.

- Stevens L. (1997). Sex chromosomes and sex determining mechanisms in birds. *Science Progress*, 80, 197–216.
- Swartz W. J. (1982). Acid and alkaline phosphatase activity in migrating primordial germ cells of the early chick embryo. *Anat. Rec*, 202, 379–385.
- Swift C.H. (1914). Origin and early history of the primordial germ cells of the chick. *Am. J. Anat*, 18, 483–516.
- Szalay I. (2015). Régi magyar baromfifajták a XXI. században. In *M. Mezőgazda Kiadó*.
- Szalay I., & Koppány G. (2017). Haszonállataink in vivo fajtavédelmi rendszere, a génbanki állományok kialakításának és fenntartásának hagyományos tenyésztési módszerei. In *Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében* (pp. 13–28).
- Tagami, T., Miyahara, D., & Nakamura, Y. (2017). Avian primordial germ cells. In *Advances in Experimental Medicine and Biology* (Vol. 1001, pp. 1–18). Springer New York LLC. https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_1
- Tajima A. (2002). Production of germ-line chimeras and their application in domestic chicken. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 13, 15–30.
- Tajima, A., Graham, E. F., Shoffner, R. N., Otis, J. S., & Hawkins, D. M. (1990). Research Note: Cryopreservation of Semen from Unique Lines of Chicken Germ Plasm. *Poultry Science*, 69(6), 999–1002. <https://doi.org/10.3382/PS.0690999>
- Tajima A., Hayashi H., Kamizumi A., Ogura J., Kuwana T., & Chikamune T. (1999). Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *J. Exp. Zool*, 284, 759–764.
- Tokodyné Szabadi, N., Tóth, R., Lázár, B., Ecker, A., Urbán, M., Várkonyi, E., Liptói, K., & Gócza, E. (2024). Hőkondicionálás hatására létrejövő molekuláris változások vizsgálata a házityúkok agyszövetében. *Magyar Állatorvosok Lapja*, 146(2), 67–75. <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2024.02.67-75>
- Tomura, M., Ikebuchi, R., Moriya, T., & Kusumoto, Y. (2021). Tracking the fate and migration of cells in live animals with cell-cycle indicators and photoconvertible proteins. *Journal of Neuroscience Methods*, 355, 109127. <https://doi.org/10.1016/J.JNEUMETH.2021.109127>
- Tóth R., Szabadi N., Lázár B., Buda K., Végi B., Barna J., Várkonyi E., Liptói K., Pain B., Gócza E. (2021). Effect of post-hatch heat-treatment in heat-stressed transylvanian naked neck chicken. *Animals*, 6, 11. <https://doi.org/10.3390/ani11061575>
- Tsunekawa N., Naito M., Sakai Y., & Noce T. (2000). Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*, 127, 2741–2750.
- van de Lavoie M. C., Diamond J. H., Leighton P. A., Mather-Love C., Heyer B. S., Bradshaw R., Krechner A., Hooi L. T., Gessaro T. M., Swanberg S. E., Delany M. E., & Etches R. J. (2006). Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 441, 766–769.
- Váradí É., Végi B., Liptói K., & Barna J. (2013). Methods for cryopreservation of guinea fowl sperm. In *PloS One: Vol. 8 (4)*.
- Wakely J., & England M. A. (1979). Scanning electron microscopical and histochemical study of the structure and function of basement membranes in the early chick embryo. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 206, 329–352.
- Waldeyer, W. (1870). *Eierstock un Ei, Ein Beitrag zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Sexualorgane*. Рипол Классик.
- Whyte, J., Glover, J. D., Woodcock, M., Brzeszczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., Kaiser, P., & McGrew, M. J. (2015). FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports*, 5(6), 1171–1182. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.10.008>
- Yano S., & Hoffman R. M. (2018). Real-Time Determination of the Cell Cycle Position of Individual Cells within Live Tumors Using FUCCI Cell-Cycle Imaging. *Cells*, 7.
- Yoshinaga K., Fujimoto T., Nakamura M., & Terakura M. (1992). Selective lectin-binding sites of primordial germ cells in chick and quail embryos. *Anat. Rec*, 233, 625–632.
- Zielke, N., & Edgar, B. A. (2015). FUCCI sensors: Powerful new tools for analysis of cell proliferation. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* (Vol. 4, Issue 5, pp. 469–487). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/wdev.189>

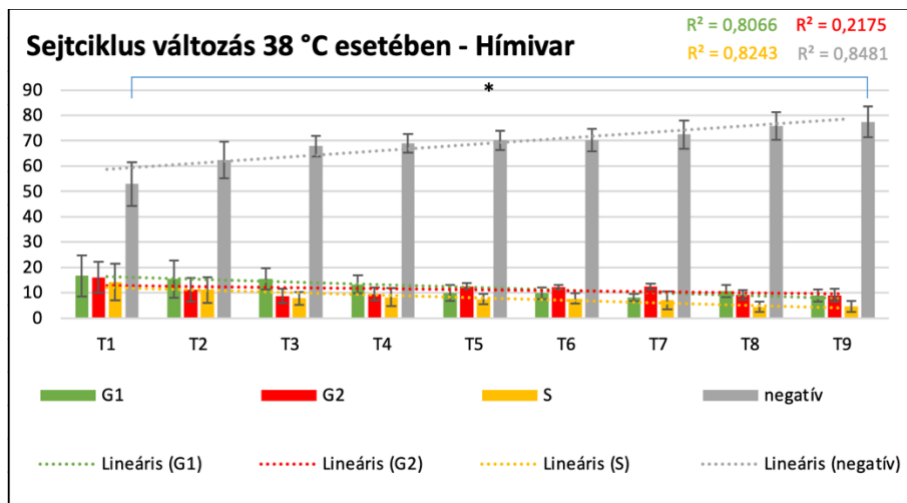
8. Táblázatok és ábrák jegyzéke

2. ábra: A PGC-k vándorlása (Kim – Han, 2018), 7. oldal
2. ábra: A: a FUCCI sejtek által expresszált jelek változása a sejtciklus során (Sakaue-Sawano et al., 2008). B: FUCCI PG sejtek (Ecker et al., 2024), 15. oldal
2. táblázat: A tenyésztőmedium összetevői és azok mennyisége (Whyte et al., 2015), 17. oldal
3. ábra: A plate elrendezése, 18. oldal
4. ábra: Bal oldal: képernyőkép az ImageXpress Pico kezelési felületéről, egy sárgán, egy zölden és egy pirosan expresszáló sejt látható; Jobb oldal: képernyőkép az ImageXpress Pico kezelési felületről, maszkolás beállítása, 19. oldal
1. diagram: Proliferációs ráta, 22. oldal
2. diagram: Sejtciklus változás a kontroll csoportban, 23. oldal
5. ábra: Bal oldal: A kontroll csoport sejtjei T1 időpontban; Jobb oldal: A kontroll csoport sejtjei T9 időpontban, 23. oldal
3. diagram: Sejtciklus változása 40°C-os hőkezelés hatására, 24. oldal
6. ábra: Bal oldal: A 40°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T1 időpontban; Jobb oldal: A 40°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T9 időpontban, 24. oldal
4. diagram: Sejtciklus változása 41°C-os hőkezelés hatására, 25. oldal
7. ábra: Bal oldal: A 41°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T1 időpontban; Jobb oldal: A 41°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T9 időpontban, 26. oldal
5. diagram: Sejtciklus változása 42°C-os hőkezelés hatására, 27. oldal
8. ábra: Bal oldal: A 42°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T1 időpontban; Jobb oldal: A 42°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T9 időpontban, 27. oldal
6. diagram: Sejtciklus változása 43°C-os hőkezelés hatására, 28. oldal
9. ábra: Bal oldal: A 43°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T1 időpontban; Jobb oldal: A 43°C-os hőkezelésen átesett csoport sejtjei T9 időpontban, 28. oldal
7. diagram: Pirosan expresszáló sejtek változása nőivarban, 29. oldal
8. diagram: Pirosan expresszáló sejtek változása hímivarban, 30. oldal
9. diagram: Mindkét markerre pozitív sejtek változása nőivarban, 31. oldal
10. diagram: Mindkét markerre pozitív sejtek változása hímivarban, 31. oldal
11. diagram: Zölden expresszáló sejtek változása nőivarban, 32. oldal
12. diagram: Zölden expresszáló sejtek változása hímivarban, 33. oldal

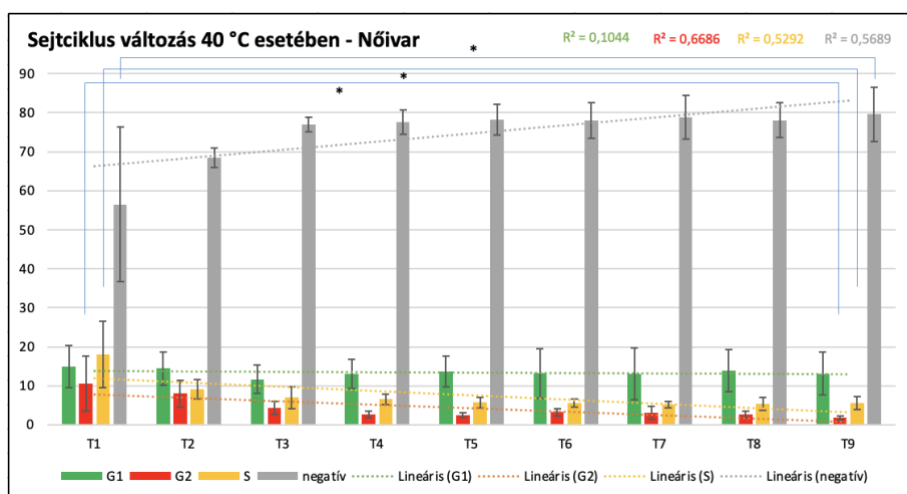
9. Mellékletek



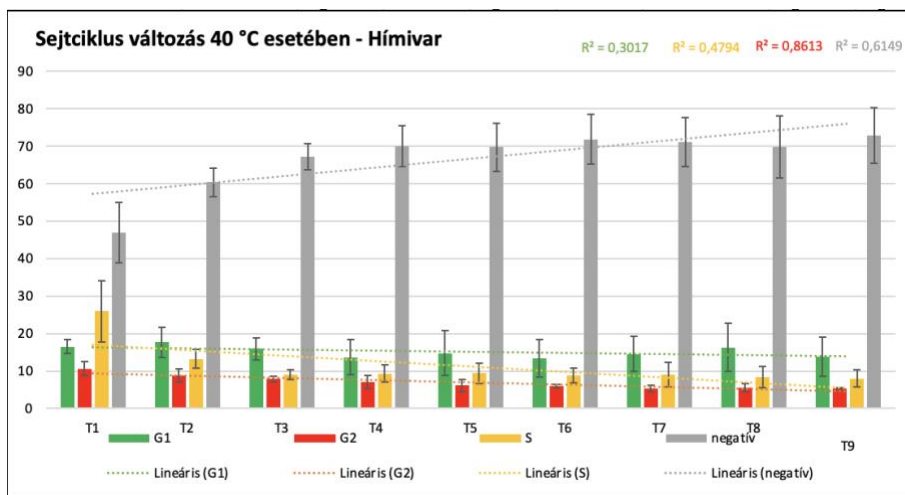
1. diagram: Sejtciklus változás a kontroll csoportban nőivarban



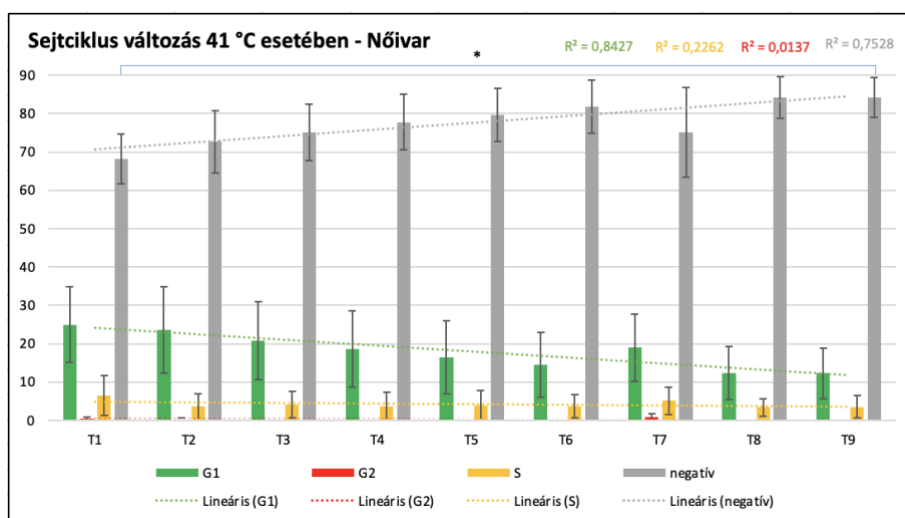
2. diagram: Sejtciklus változás a kontroll csoportban hímivarban



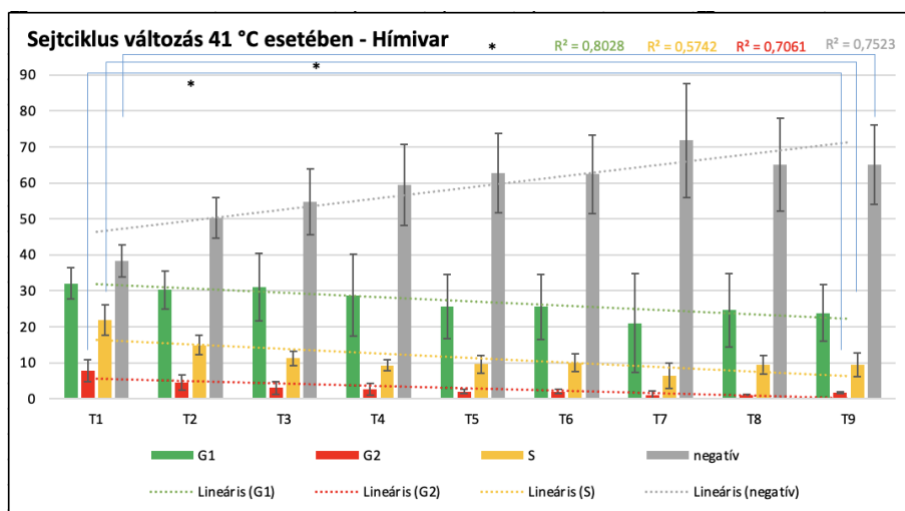
3. diagram: Sejtciklus változás 40°C-os hőkezelés hatására nőivarban



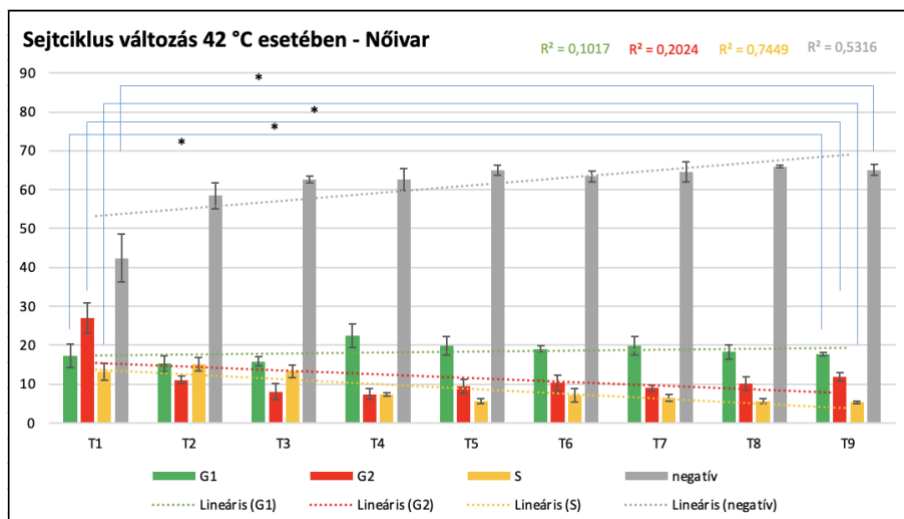
4. diagram: Sejtciklus változás 40°C-os hőkezelés hatására hímivarban



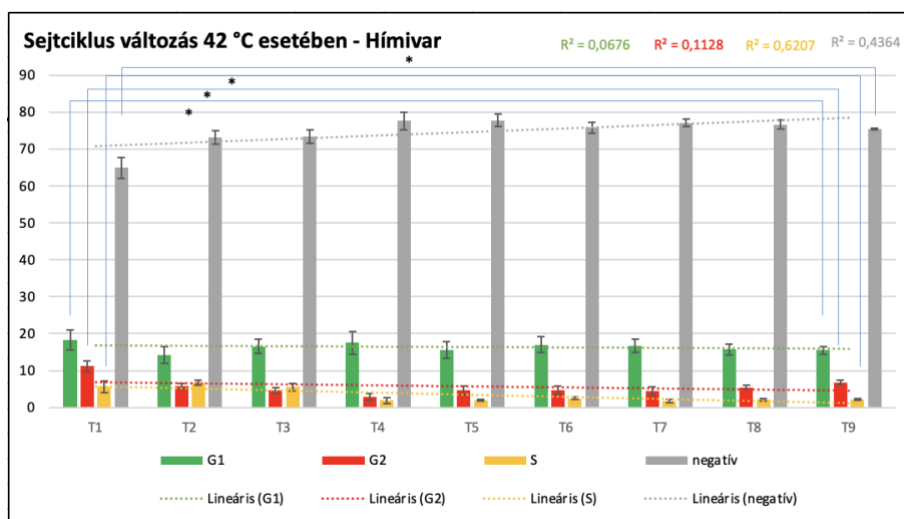
5. diagram: Sejtciklus változása 41°C-os hőkezelés hatására nőivarban



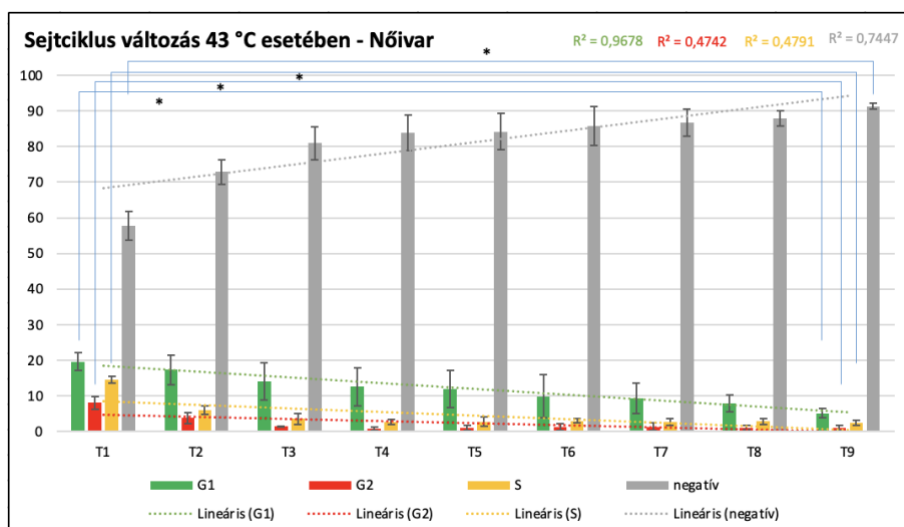
6. diagram: Sejtciklus változás 41°C-os hőkezelés hatására hímivarban



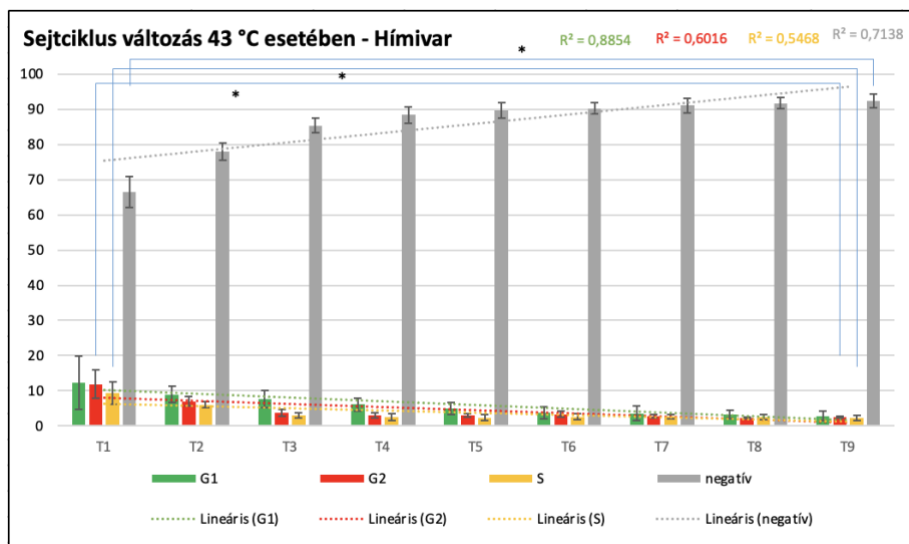
7. diagram: Sejtciklus változás 42°C-os hőkezelés hatására nőivarban



8. diagram: Sejtciklus változás 42 °C-os hőkezelés hatására hímivarban



9. diagram: Sejtciklus változás 43°C-os hőkezelés hatására nőivarban



10. diagram: Sejtciklus változás 43°C-os hőkezelés hatására hímivarban

10. Hallgatói nyilatkozat

MATE Szervezeti és Működési Szabályzat

III. Hallgatói Követelményrendszer

III.1. Tanulmányi és Vizsgaszabályzat

6.13. sz. függelék: A MATE egységes szakdolgozat /
diplomadolgozat / záródolgozat / portfólió készítési útmutatója

4.2. sz. melléklete: Nyilatkozat a záródolgozat/szakdolgozat/diplomadolgozat/portfólió nyilvános hozzáféréseiről és eredetiségéről (módosítva: 2025. október 16.)

NYILATKOZAT

a szakdolgozat nyilvános hozzáféréseiről és
eredetiségéről

A hallgató neve: BOGNÁR JÚLIA
A Hallgató Neptun kódja: H80A85
A dolgozat címe: SEJTCIKLUS VÁLTOZÁS MONITOROZÁSA, CSIRKE PGC
A megjelenés éve: 2025 ALAPÚ TRANSZGÉNIKUS FÜCCI SEJTVONALAKON
A konzulens intézetének neve: GENETIKA ÉS BIOTECHNOLÓGIA INTÉZET
A konzulens tanszékének a neve: ÁLLATBIOTECHNOLÓGIA TANSZÉK

Kijelentem, hogy az általam benyújtott szakdolgozat egyéni, eredeti jellegű, saját szellemi alkotásom. Azon részeket, melyeket más szerzők munkájából vettem át, egyértelműen megjelöltem, és az irodalomjegyzékben szerepeltettem. Továbbá kijelentem, hogy a dolgozat elkészítése során alkalmazott mesterséges intelligencia-eszközök (pl. szöveggenerálás, nyelvi javítás, fordítás, adatelemzés) használata nem helyettesítette a saját kutatási és alkotói munkámat, azok alkalmazását a források között vagy a módszertani részben feltüntettem, és a szakmai-etikai elvárásoknak megfelelően jártam el.

Ha a fenti nyilatkozattal valótlan állítottam, tudomásul veszem, hogy a záróvizsga-bizottság a záróvizsgából kizár és a záróvizsgát csak új dolgozat készítése után tehetek.

A leadott dolgozat, mely PDF dokumentum, szerkesztését nem, megtekintését és nyomtatását engedélyezem.

Tudomásul veszem, hogy az általam készített dolgozatra, mint szellemi alkotás felhasználására, hasznosítására a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem mindenkor szellemi tulajdon-kezelési szabályzatában megfogalmazottak érvényesek.

Tudomásul veszem, hogy dolgozatom elektronikus változata feltöltésre kerül a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem könyvtári repozitori rendszerébe. Tudomásul veszem, hogy a megvédett és

- nem titkosított dolgozat a védést követően
- titkosításra engedélyezett dolgozat a benyújtásától számított 5 év eltelte után

nyilvánosan elérhető és kereshető lesz az Egyetem könyvtári repozitori rendszerében.

Kelt: GÖDÖLLŐ, 2025. év NOVEMBER hó 4. nap


Hallgató aláírása

Hallgatók, doktoranduszok nyilatkozata mesterséges intelligencia (MI) alkalmazásáról

1. Általános adatok

Hallgató neve:	BOGNAR JÜLIA
Neptun-kódja:	H8QA85
Képzési szint (a megfelelőt jelölje X-szel):	☒ BSc/BA ☐ MSc/MA ☐ Doktori (PhD) ☐ Egyéb:
Tantárgy neve/kódja*:	STADOLGOZAT KÉSZÍTÉS MONITORING
A munka címe:	SEJTCIKLUS VÁLTOZÁS MONITOROZÁSA CSIRKE PGC ALAPÚ TRANSGENIKUS FICCI SEJTVONALAKON

* doktori értekezés esetén nem kitöltendő

2. Nyilatkozat az MI használatáról

Alulírott, etikai felelősségem teljes tudatában az alábbi nyilatkozatot teszem:

(Kérjük, válasszon egyet az alábbi lehetőségek közül!)

☒ A) Nem alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Amennyiben ezt jelölte, a további táblázatok kitöltése nem szükséges.)

☐ B) Alkalmaztam mesterséges intelligencia rendszert vagy szolgáltatást.

(Kérjük, tölts ki a vonatkozó táblázatokat!)

3. A mesterséges intelligencia használatának részletezése

I. TÁBLÁZAT: Asszisztensi vagy kisebb mértékű felhasználás (pl. fordítás, nyelvi korrektúra, ötletelés stb.)

(Ezen felhasználások esetében a konkrét promptok és válaszok csatolása nem szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve és verziója	Érintett rész (ha nem a szöveg egészére vonatkozik)

II. TÁBLÁZAT: Jelentős tartalmi hozzájárulás (pl. egy teljes ábra vagy egy hosszabb szövegrész generálása)

(Ezekben az esetekben a felhasznált kulcsfontosságú promptok és az MI által adott nyers válaszok dokumentálása és a munka mellékletében való csatolása szükséges.)

A felhasználás célja	Alkalmazott MI-eszköz neve, verziója, elérhetősége	Az érintett fejezet / ábra / táblázat pontos sorszáma	A prompt-naplót tartalmazó melléklet bejegyzésének sorszáma

--	--	--	--

3/A. Oktató által előírt kiegészítő szabályok (ha vannak)

Amennyiben az adott tantárgy oktatója vagy témavezetője az MI-eszközök használatára vonatkozóan külön szabályokat vagy elvárásokat határozott meg, kérjük, az alábbi mezőben foglalja össze ezeket:

Pl. az MI használatának tilalma bizonyos feladattípusokra; csak konkrét eszköz használata engedélyezett; eltérő hivatkozási elvárások; dokumentációs forma stb.

Oktató vagy témavezető által előírt szabályok:

.....

.....

.....

.....

4. Minden hallgatóra vonatkozó nyilatkozat:

Kijelentem, hogy az MI által esetlegesen generált tartalmakat minden esetben kritikailag felülvizsgáltam, szerkesztettem és a munkába illesztettem. A leadott munka minden eleméért, annak eredetiségéért és tudományos helytállóságáért teljes körű felelősséget vállalok. Tudomásul veszem, hogy a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem a benyújtott munkát mesterséges intelligencia detektorral ellenőrizheti, és eljárást kezdeményezhet, amennyiben a nyilatkozatom valótlan vagy hiányos.

Kelt: GÖDÖLLŐ....., 2025. NOVEMBER hó 4. nap


Hallgató aláírása


Konzulens/Témavezető aláírása

11. Konzulensi nyilatkozat

NYILATKOZAT

BÖGNAR JULIA (név) (hallgató Neptun azonosítója: HBQA85)
konzulenseként nyilatkozom arról, hogy a szakdolgozatot áttekintettem, a hallgatót az irodalmi források korrekt kezelésének követelményeiről, jogi és etikai szabályairól tájékoztattam.

A záródolgozatot/szakdolgozatot/diplomadolgozatot/portfóliót a záróvizsgán történő védésre javaslom / nem javaslom¹.

A dolgozat állam- vagy szolgálati titkot tartalmaz: igen nem^{*2}

Kelt: 6.00.00.2025 év NOVEMBER hó 4. nap


belső konzulens

¹ A megfelelő aláhúzendő.

² A megfelelő aláhúzendő.