

GERINCDEFORMITÁS A PONTYBAN (*CYPRINUS CARPIO*): HSP70 ÉS HSP90 GÉNEK RELATÍV EXPRESSZIÓJÁNAK ÉS A GERINC NÉHÁNY MAKRO- ÉS MIKROELEM TARTALMÁNAK ÖSSZEFÜGGÉS-VIZSGÁLATA

LENGYEL ANGÉLA KINGA – BALOG KATALIN – BAGI ZOLTÁN – HEGEDŰS BETTINA –
BARANYAI EDINA – FEHÉR MILÁN – BÁRSONY PÉTER – KUSZA SZILVIA

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők a ponty állományokban jelentős károkat okozó gerincdeformitás kialakulását befolyásoló tényezőket vizsgálták. Több szövettípusban (vér, hátizom, agyvelő) elemezték hőstressz gének (HSP70, HSP90) relatív expressziós szintjeit, majd ezeket az eredményeket összevetették a gerincoszlop makro- és mikroelem tartalmával. A HSP70 relatív expressziójának mértéke mindhárom szövettípusban magasabb volt a deformált halak esetében, mint a normál csoportban, ami jelzi a gén érintettségét a szervezet immunválaszában. A HSP90 relatív expressziója vér és agyvelő szövetekben alacsonyabb volt a deformált csoportban, míg a hátizomban a deformált csoport mRNS szintje volt magasabb. A HSP90 elsődleges funkciója a sejt-növekedéshez és a túléléshez kapcsolódik, ezért a HSP90 ígéretes jelölt lehet a deformitások kezelésében. Statisztikailag szignifikáns különbség nem mutatkozott a csoportok között egyik gén esetében sem. A gerincoszlop makro- és mikroelem tartalmának vizsgálata során a normál és deformált csoportok között szignifikáns eltérés nem mutatkozott. Ugyanakkor a relatív expressziós szintek bevonásával készített összefüggésvizsgálatok több szignifikáns kapcsolatot tártak fel. A legtöbb esetben a hátizomban mért HSP70 mRNS szint, illetve a kálium volt érintett ilyen összefüggésekben.

SUMMARY

Lengyel, A. K. – Balog, K. – Bagi, Z. – Hegedűs, B. – Baranyai, E. – Fehér, M. – Bársony, P. – Kusza, Sz.: SPINAL DEFORMITY IN COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO*): ASSOCIATION STUDY BETWEEN RELATIVE EXPRESSION OF HSP70 AND HSP90 GENES AND MACRO- AND MICROELEMENT CONTENT OF SPINAL

In the present study we investigated, in carp, the relative expression levels of two heat stress protein genes, HSP70 (70 kDa heat stress protein) and HSP90 (90 kDa heat stress protein gene), which may be associated with spinal deformity. Our aim was to draw conclusions about spinal deformity from the results of tissue-specific analysis of these heat stress genes. For this study, 20 common carp individuals of the same breed and age, reared under the same housing conditions were selected. The relative expression levels of the genes were different in the different tissue types studied (blood, dorsal muscle, brain). In addition, we examined the macro- and microelement content of the spinal columns of normal and deformed individuals and whether these results are related to the relative gene expression of the genes studied. The relative gene expression levels of HSP70 in all the three tissue types were higher in the deformed fish than in the normal group. The higher levels of HSP70 expression in deformed individuals played an important role in the normal functioning of cells, thereby compensating the negative effects of deformity, appearing in a „protective” role. The increased level of the relative expression of the heat stress protein gene could also be caused by the induction of further HSP70 production by damaged HSP70 protein. In summary, the HSP70 heat stress protein gene has physiological properties that play a role in maintaining normal cell function. The level of HSP90 heat stress protein gene expression in blood and brain was lower in the deformed fish than in the normal group, except in the dorsal muscle, where the value of the deformed group was higher. The increased relative gene expression level of the heat stress protein HSP90 in the dorsal muscle plays a role in normal muscle formation and contributes to the stability of protein function. Lower levels of relative gene expression in blood and brain are due to defects

in signal transduction and protein tyrosine kinase receptor function, thereby contributing to spinal deformity. The HSP90 gene is associated with cell growth and, consequently, inhibition of HSP90 would be a promising approach to treat deformities. There was no significant difference between the macro- and microelement contents of the spines of the normal and deformed groups. However, correlation analyses involving macro- and microelement contents and relative expression levels revealed several significant correlations, most of which concerned potassium on the one hand and the level of HSP70 mRNA in the dorsal muscle on the other. This study may allow to reduce the incidence of recurrent spinal deformities in the future by minimizing or even counteracting the effects of heat stress. Our results may contribute to preventive measures that could significantly reduce the problems caused by severe malformations in carp.

BEVEZETÉS

A világ lakosságának növekedése napjainkban komoly kihívás elé állítja az élelmiszeripart és a mezőgazdaságot. A növekedés következtében az állattenyésztésben is fontossá vált az időtényező, így megjelentek intenzív tartási technológiák, melyeknek a számos előnye mellett a hátrányaival is számolnunk kell. Az egyik ilyen hátrány a gerinc deformitásának jelensége, mely a brojler csirkék és a sertések mellett számos tenyésztett európai halfajt is érinthet. A gerinc deformitásának következtében az állatjóléti problémák mellett filézési nehézségek léphetnek fel, illetve a hasított test gyengébb minőségű lehet, így a termelők jelentős gazdasági károkat szenvedhetnek el. Ugyan a valódi gazdasági veszteségeket nehéz pontosan megbecsülni, de az európai akvakultúra ágazatban okozott minimális éves veszteség meghaladhatja az 50 millió eurót évente, és feltételezhető, hogy ennek 50%-a a csontváz deformitásainak és rendellenességeinek köszönhető (Bostock és mtsai, 2016; Shefat és Karim, 2018). Ezért a halak gerincdeformációinak vizsgálata az akvakultúra-ágazatban több figyelmet igényel napjainkban. A terület ugyan az elmúlt években egyre népszerűbb lett, és előrelépés is történt az ok-okozati tényezők feltárása és a jobb tenyésztési eljárások kidolgozása terén is, de a probléma továbbra is fennáll, és jelentős veszteséget okoz az iparág számára. Fontos tehát ennek az egészségügyi problémának a minél alaposabb megismerése és a hozzá köthető folyamatok feltárása az intenzív rendszerekben történő haltenyésztés fejlesztése érdekében.

A gerincdeformitás egy olyan fejlődési rendellenesség, amely a gerinc alakjának kóros mértékű elváltozásait foglalja magába (Vagsholm és Djupvik, 1998). A rendellenességnek sokféle megjelenési formája lehet, mértéke változó, az enyhébb formától a súlyosabb állapotig terjedhet. A csontos halak nagyon érzékenyek a fejlődési gerincdeformációkra, mivel a csontrendszer fejlődése és növekedése olyan folyamat, amelyeket számos tényező befolyásolhat. Az erre hajlamosító tényezők közé tartoznak például nem öröklődő veleszületett rendellenességek (Boglione és mtsai, 2013), tenyésztési és takarmányozási technikák (Kasprzak és mtsai, 2018), gyulladásal járó vagy fizikai traumás sérülések (Roberts, 2012), környezeti problémák és mérgező anyagok (például a nehézfémek) (Lavado és mtsai, 2012; Boglione és mtsai, 2013; Sfakianakis és mtsai, 2015), továbbá paraziták (Yokoyama és mtsai, 2005; Roberts, 2012) és néhány patogén baktérium (Madsen és Dalsgaard, 1999), valamint az örökletes genetikai okok (Hansen és Puvanendran, 2010). Ezek közül sok tényezőt gazdálkodási körülmények között lehet manipulálni, és így kockázati tényezőknek tekinthetők.

A deformitások különböző csontrendellenességek komplex keverékei, beleértve a csigolya és a gerinc alakulását. A fentiek tükrében a torzulások kísérletes vizsgálata a gerincdeformációk jobb megértését szolgálhatja, ami javíthatja a kezelési lehetőségeket. Jelen tanulmányban a HSP70 és HSP90 hőstresszfehérje gének relatív expressziós szintjének változásait vizsgáltuk egészséges és gerincdeformált halak kísérleti csoportjaiban, hátizom, agyvelő és vér szövettípusokban. Ezeket az eredményeket összefüggésvizsgálatok segítségével összevetettük a gerincoszlop makro- és mikroelem (Ba, Ca, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, Sr, Zn, S) tartalmaival is. Az eredményekből következtetéseket vonhatunk le a gének szerepéről a gerincdeformitás kialakulásában, ezzel hozzájárulva az akvakultúra ágazat fejlődéséhez és a deformitások mértékének csökkentéséhez.

IRODALMI ÁTTEKINÉS

A halak gerincdeformításával összefüggésbe hozható abiotikus tényezők

A halak gerince normál esetben egy, hátrafelé konvex „S” görbületet mutat (De Jonge, 2001). A torzulás során a gerincoszlop tengelye megrövidül, aminek következtében a hal teste a hátúszók mögött megtörik, így a hal teste aránytalanul magas és tömzsi lesz. Ez természetesen más, mint a jó táplálkozási viszonyok között élő halak hátának íveltsége. Különböző alakú gerincferdeségek ismeretesek, függőleges és vízszintes síkban egyaránt. Különbséget lehet tenni a gerincferdülés irányában, mértékében és abban is, hogy a torzulás a gerinc melyik szakaszán jelent meg (*scoliosis*, *lordosis* és *kyphosis*).

A víz hőmérséklete az egyik tényező, amely a csontrendszeri deformációk kialakulásához vezethet, de valamilyen ikráérést és keltetést befolyásoló környezeti hatás is okozhatja. Farkassügéren (*Dicentrarchus labrax*) végzett vizsgálatok szerint a 20 °C-os víz hőmérsékleten nevelt halakban gyakrabban fordult elő gerincor torzulás, mint a 15 °C-os vízben nevelteknél. A magasabb víz hőmérsékleten gondozott halak közel felét a súlyos deformáció miatt nem tekintették piac-képesnek (Sfakianakis és mtsai, 2006). Bármely halfajon kialakulhatnak ezek a tünetek, azonban leggyakrabban tógazdaságban előnevelt halakon figyelhetők meg. Természetes vízi halakon a deformitás ritka, mivel a torzult forma miatt a rendellenes egyedek még korai ivadék korban áldozatul esnek a ragadozóknak (Molnár, 2003).

A hal organizmusokban a leggyakrabban előforduló nehézfémek közül a kadmiumot, a rezet, az ólmot, a cinket, a higanyt és a krómot vizsgálták leggyakrabban a halak deformitását illetően (Ahmed és mtsai, 2017). Ezekről a nehézfémekről ismert, hogy neuromuszkuláris károsodásokat okoznak, így a csontrendszeri alakváltozások következtében a fejlődési folyamatok károsodása, illetve csontváz deformációk léphetnek fel. Az ólom (Pb) és a kadmium (Cd) krónikus jelenléte a halak gerincének kóros deformációját és zsugorodását eredményezte (Davies és mtsai, 1976; Muramoto, 1981).

A táplálkozási tényezők és bizonyos tápanyagok a legjelentősebbek a csontrendszeri rendellenességek kialakulásában. Számos szerző vizsgálta különböző tápok hatékonyságát a növekedésre, illetve az esetleges negatív hatásait is (Wolnicki és mtsai, 2006; Demény és mtsai, 2009; Demény és mtsai, 2011; Printzi

és mtsai, 2021). Demény és mtsai 2009-ben rétcsík lárvákat (*Misgurnus fossilis*) etettek három féle módon (kereskedelemben kapható táppal, keverékkel és élő eleséggel), a kísérlet első 10 napjában torzulás az élő eleséget kapó csoportban nem alakult ki, míg a két tápot fogyasztó csoportban kisebb részükön gerinc-torzulások, többségükön pedig fejtorzulások jelentkeztek. Egy hasonló kísérleti beállításban különböző takarmányok növekedésre gyakorolt hatását vizsgálták széles kárászokon (*Carassius carassius*). A kísérlet során az élő eleséggel etetett csoportban nem fordult elő deformáció, míg a vegyesen etetett csoportokban (táp alapú takarmányozás heti egyszeri természetes takarmány kiegészítéssel) különféle torzulások fordultak elő. A táppal etetett csoportban fordultak elő torzulások a legnagyobb százalékban ($23,3 \pm 7,6\%$) (Demény és mtsai, 2011). Compókon (*Tinca tinca*) is végeztek ilyen típusú kísérletet, négy kereskedelmi forgalomban lévő táppal, melyből három esetében akár 96,4%-os külső testdeformáció is előfordult (Wolnicki és mtsai, 2006). Mindegyik kísérlet megfigyelései egybevágnak, ugyanis a magas fehérje és zsírtartalmú tápok etetése révén a halak zsírtartalma majdnem kétszerese lett a kísérlet végére, mint az alacsonyabb az élőeleséggel etetett csoportokban, mely a nagyfokú deformációkat is okozhatta.

A szervezet alapvető fiziológiai folyamatainak megfelelő működéséhez nélkülözhetetlenek a makro- és mikroelemek (Pyz-Lukasik és Chałabis-Mazurek, 2019). Egyes vitaminokkal ellentétben ezeket az elemeket nem lehet szintetizálni, így csak táplálékkal juthatnak be a szervezetbe. Egyre több kutatás vizsgálja az élettani szerepüket a gerincdeformitással összefüggésben is (Bagi és mtsai, 2022). Jelen tanulmány esetében érdemes kiemelni a káliumot, ugyanis a gyors elektromos potenciál változás miatt az ideg és izomszövetek működéséhez elengedhetetlen (Kowey, 2002). A víz alacsony káliumszintje miatt a vázizomzat súlyos degenerációját és nekrozisát, a sejtek kifejezett hiperpláziáját és a vese tubuláris nekrozisát tárták fel barramundi halakban (Partridge és Creeper, 2004).

Genetikai tényezők

A deformitás öröklődésének nagysága és a különböző gazdaságok halainak deformitása közötti genetikai korrelációk mennyisége azt támasztja alá, hogy a csigolya deformitását additív genetikai összetevő határozza meg (Gjerde és mtsai, 2005). A deformitás és a testsúly között alacsony genetikai összefüggéseket véltek felfedezni. A beltenyésztés együtthatója és a teljes családok deformitására vonatkozó tenyésztési értékek közötti alacsony korreláció határozottan azt jelzi, hogy a beltenyésztés nem jelentős oka a vizsgált gerincdeformitásnak (Gjerde és mtsai, 2005). Pontyok fejdeformációs vizsgálata során a gerinc deformációit is megfigyelték. A tenyésztett utódok között nem észleltek rendellenességet, ami genetikai tényezőkre utalna a deformációk lehetséges okaként (Kužir és mtsai, 2015). Ebből a feltevésből adódóan szelektív tenyésztési kísérlet során vizsgálták pontyok uszonyának deformációit, ám a deformációk közötti genetikai korreláció többnyire negatív és pontatlan volt, a beltenyésztés hatása pedig nem magyarázta a tulajdonságok varianciáját (Kocour és mtsai, 2006). Hasonló eredményt kapott Eissa és mtsai (2009), aki két helyszínről begyűjtött csontos halak vázrendszeri rendellenességeit kutatta és eredményeit deformációk előfordulásának és mértékének változása jellemezte. Nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*), afrikai harcsa

(*Clarias gariepinus*) és ponty esetében a deformált egyedek ritkábbak voltak a természetes populációkban, mint a gazdaságokban. Mindezekről függetlenül azonban nem lehet egyértelműen kizárni a genetikai komponenst a jelenség kialakulásáért felelős tényezők közül. A molekuláris genetikai módszerek fejlődését kihasználva érdemes új megközelítésekben és új módszerek bevonásával is kutatni a gerincdeformitás kialakulásának hátterét.

A hőstressz fehérje gének általános jellemzése

A stresszfehérje gének a sejtek kulcsfontosságú elemei közé tartoznak, nélkülözhetetlen szerepet játszanak a sejtek életében normál körülmények között, és akkor is, amikor a sejteket vagy az egész szervezetet károsodás, stressz éri. Az emberi és állati sejtekben a riboszómákon létrejövő, vagyis az RNS-ről meghatározott aminosav sorrendben összeépülő fehérje gének segítséget igényelnek ahhoz, hogy elfoglalják végső, a működésükhöz létfontosságú szerkezetüket. Ez csavarodás vagy tekeredés útján valósul meg. Legfontosabb szerepük, hogy a normál körülmények között vagy leginkább a sejtet ért ártalom hatására, a nem megfelelő szerkezetű, azaz a többé-kevésbé kitekeredett és visszatekeredő fehérjéket támogassák abban, hogy eredeti felépítésüket visszakapják. Részt vesznek még a jelátviteli folyamatokban, a már nem javítható proteinek lebontásában és a programozott sejthalálban is (Füst és mtsai, 2003).

HSP70 (Heat shock protein 70) és HSP90 (Heat shock protein 90)

A 70 kDa-os hőszokkfehérje (HSP70) egy igen konzervált fehérje, mely a stresszfehérjék egyik legismertebb képviselője. Hasonló szerkezetű fehérjék gyakorlatilag minden élő szervezetben léteznek. A HSP70-ek segítenek megvédeni a sejteket a stressztől. A HSP70 hőstressz fehérjét kódoló gének konzervált génszakaszokon helyezkednek el és fejeződnek ki változatos stressztényezők hatására (Yoshimune és mtsai, 2002). A HSP70 hőstressz fehérjét a HSPA1A, HSPA1B, HSPA1L, HSPA2, HSPA5, HSPA6, HSPA7, HSPA8 és HSPA9 hőstressz fehérje gének kódolják (Yang és mtsai, 2015). A HSPA1A gén, mely több fehérje mellett a HSP70 hőszokkfehérjét is kódolja, egy intron nélküli gén. A HSPA1A és HSPA1B a sejtmagban és a citoplazmában helyezkednek el. A HSPA1L aminosavszekvenciája 90%-os homológiát mutat a HSPA1A és HSPA1B izoformákkal, viszont már rendelkezik intronokkal. Bár a HSPA1A és HSPA1B-hez hasonló homológiát mutat, eltérően szabályozódik és nem hő-indukálható. Általában a HSPA1L alacsony szinten expresszálódik a szövetekben (Yang és mtsai, 2015).

A HSP90 egy chaperon fehérje, amely segíti más fehérjék megfelelő összehúzóását, stabilizálja a fehérjéket a hőstressz ellen, és segíti a fehérje lebomlását. HSP90 baktériumokban és az eukarióták minden ágában jelen lévő, a citoplazmában az egyik legnagyobb mennyiségben megtalálható fehérjégen (Truman és mtsai, 2007). Két izomorf formája létezik, a HSP90 α és HSP90 β (Truman és mtsai, 2007). A HSP90 hőstressz fehérjét a HSP90AA1, HSP90AA2, HSP90AB1 és a HSP90B1 hőstressz fehérje gének kódolják. A HSP90AA1 gén, mely a HSP90 α hőszokkfehérjével áll kapcsolatban, két különálló mRNS transzkriptumot kódol, amelyeket külön transzkripciósi starthelyektől indítottak. A HSP90AA1 és

HSP90AA2 molekuláris chaperoning képességét az ATP hidrolízis által táplált strukturális átrendeződési ciklus hajtja. A hasonló aminosav-szekvencia megosztása ellenére a HSP90A expresszióját más módon szabályozzák, mint a HSP90B1 expresszióját. A HSP90A a stresszindukálható izoform módon, míg a HSP90B1 konstitutívan expresszálódik (Chen és mtsai, 2005).

Hőstressz gének szerepe a gerincdeformításban

A hőstressz fehérjék tehát az élő sejtekben a megemelkedett hőmérsékletre (a hősokkra) válaszul fokozott mértékben termelődnek, továbbá igen nagy mennyiségben vannak jelen, a szervezetek létfontosságú alkotóelemeit képezik. A HSP gének hősokkra és egyéb stresszfaktorokra adott válaszai a hősokk transzkripciósfaktor (HSF) aktiválásán keresztül történnek (Chen és mtsai, 2005), ezek a hősokk-faktorok egy célszekvenciához, az úgynevezett hősokk-elemhez (HSE) kötődnek, amelyek a hő promoterekben találhatóak (Chen és mtsai, 2005). Számos kutatás vizsgálta már a hősokk fehérjék expresszióját halakban, (Iwama és mtsai, 1998; Machado és mtsai, 2017). Vijayan és mtsai 1998-ban arra a következtetésre jutottak, hogy a máj, a vese és a kopoltyúszövetek azok, amelyek a leginkább érzékenyek a HSP gének válaszára (Vijayan és mtsai, 1998). Ezt pedig alátámasztja Rajeshkumar és Munuswamy (2011) munkája, mely során szövettani és immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztek tejhalban (*Chanos chanos*), egy nehézfémekkel szennyezett területről. A szennyezett területről gyűjtött halakban szövettani elváltozásokat detektáltak, például az izomban az izomrostok megduzzadtak, az izomkötegek pedig lebomlottak. A hepatociták is károsodtak ezekben a halakban, továbbá szabálytalan májlemez-repedéseket figyeltek meg. Az immunfestési analízis azt mutatta, hogy a HSP70 nagy intenzitással expresszálódik a szennyezett helyről gyűjtött halak szöveteiben, a kevésbé szennyezett helyekről összegyűjtött egyedekkel ellentétben. A HSP70 pozitív sejteket szövetszövetként hat helyen tártak fel, a két helyről származó eredmények pedig statisztikailag szignifikánsan eltértek (Rajeshkumar és Munuswamy, 2011). A HSP70 magas expressziós szintje a celluláris stresszválasz érzékeny indikátoraként szolgálhat a szennyezett környezetre. Olsvik és mtsai szintén 2011-ben a higannyal (Hg) dúsított üledékek hatásait vizsgálta halakban. A kísérlet során a toxikus üledékű akváriumokban tartott atlanti tőkehalakban (*Gadus morhua*) a kalretikulin, a HSP70 és a hem oxigenáz mRNS szintje szignifikánsan nőtt a kopoltyújukban és a májban. A konklúzió az volt, hogy az üledékhez kötött higany elérhető a halak számára, és befolyásolja az oxidatív stresszre reagáló enzimek transzkripcióját (Olsvik és mtsai, 2011). Sassi és mtsai 2012-ben a kadmium (Cd) expozícióját vizsgálták, illetve azt, hogy ez a stresszfaktor befolyásolja-e a csontképződés mechanizmusát, illetve a folyamatban részt vevő gének expresszióját aranydurbincsban (*Sparus aurata*). A kísérletbe stressz biomarkernek a HSP géneket választották, ugyanis ezek szintézise megnő a fizikai és kémiai stresszorok fokozódásával (Sassi és mtsai, 2012). A 6 napos expozíció során ellentmondásos eredmények születtek, ugyanis a HSP70 csökkent expressziót mutatott a 0,1mg/l és a 10 mg/l-es koncentrációs csoportokban is a kontroll csoporthoz képest. Ezt az eredményt azzal magyarázták, hogy az expozíció időtartama rövid lehetett, illetve a csökkenő tendenciát okozhatta az is, hogy az egyedek korábban már

lehet, hogy érintkeztek kadmiummal, így beindult egy egyfajta alkalmazkodási/tűrési mechanizmus. Ezzel egyidőben az osteocalcin gén transzkriptum szintjét is mérték a kadmium expozíció alatt, mivel az osteocalcin a csontfejlődési mechanizmus és mineralizáció egyik fontos eleme. A kísérlet ideje alatt az egyedek a középső csigolya és a farokúszó komplex csontosodásán estek át, így az 5 és 10 mg/l-es koncentrációjú csoportokban az osteocalcin relatív transzkripció szintje jelentősen lecsökkent.

Wargelius és mtsai 2005-ben arra keresték a választ, hogy a hő sokk milyen hatással lehet a szomitogenezisre és a csigolya deformitásának kialakulására atlanti lazacokban (*Salmo salar*). A szomitogenezis során a fejlődő embrióban kialakulnak a porcok és inak (Wargelius és mtsai, 2005). Az embriókat a fejlődés korai szakaszában, különböző hirtelenséggel fellépő hőmérsékletváltozások során figyelték. 10 hónappal később ezeknél az egyedeknél a farokcsigolyák elváltozásának aránya viszonylag magas volt (27-34%). Két gént azonosítottak, amelyek a csontváz fejlődéséhez szükséges markereket kódolták, nevezetesen a gének a szekretált fehérje, az Shh (Sashh) és a Twist transzkripció faktor (Satwist) voltak (Wargelius és mtsai, 2005). Az embriókban megváltozott ezeknek a fehérjéknek az expressziója, így mivel ezek részt vesznek a szklerotóma proliferációjában, így azt a következtetést vonták le, hogy a különböző mértékű hőstressz hatással van a szklerotóma működésére. A kísérlet során érdekes volt, hogy különböző életszakaszokban az egyedek hőstressz elleni védekező mechanizmusai eltérőek voltak, ugyanis a génexpresszió csökkenése nem volt minden szakaszban kimutatható, illetve nem az összes egyedet érintette a deformitás jelensége.

Galt és mtsai (2016) a kortizol hatásait vizsgálták az izomfejlődéssel kapcsolatban, miosztatin, illetve HSP90 gének expressziójával lazacfélékben. A tanulmányba a királylazacot (*Oncorhynchus tshawytscha*), az orgyilkos pisztrángot (*Oncorhynchus clarki*), a pataki pisztrángot (*Salvelinus fontinalis*) és az atlanti lazacot (*Salmo salar*) vonták be. Az emlősökben a glükokortikoidok szabályozzák az izomnövekedést gátló miosztatint a glükokortikoid válasz elemeken keresztül, ami izomsorvadáshoz vezethet (Galt és mtsai, 2016). Korábbi vizsgálatok arra utalnak, hogy ez a szabályozó mechanizmus a gerincesek körében konzervált, azonban a halak esetében ez még nem igazán ismert. Ezért ennek a tanulmánynak az volt a célja, hogy vizsgálja a kortizol hatását a miosztatinra és a HSP90 expressziójára, illetve az, hogy megállapítsa, előfordultak-e eltérések a különböző lazacfajokban. A lazacfélék intraperitoneálisan kortizolt kaptak (50 µg/l/testsúly), majd 48 óra elteltével értékelték a génexpresszió mértékét. A plazma glükóz és kortizol szintjét a kortizol minden fajtában szignifikánsan megemelte, ami a kezelés fiziológiai hatékonyságát mutatta. Összefoglalva a 3 nemzetségből származó 4 faj eredményei azt mutatják, hogy a kortizol mennyisége képes szabályozni a HSP90-et az izmokban.

Bildik és mtsai (2019) a HSP30, HSP70, HSP90 és az IGF-1 hőmérsékletre adott válaszreakcióit és génexpresszióját vizsgálták aranydurbincs (*Sparus aurata*) egyedekben. A HSP70 mRNS relatív expressziós szintje az izomban a januári hónapban szignifikánsan magasabb volt, mint júliusban (körülbelül 1,7-szerese), míg a HSP30 gén expressziója a májban júliusban kétszeresére nőtt. Viszont a vizsgált szövetekben (máj, izom) a hőmérsékletváltozások nem befolyásolták az IGF-I és a HSP90 gének transzkripcióját. A HSP70 és HSP30 gének expressziója szezonális változást mutatott.

A fent említett irodalmak is alátámasztják azt, hogy a hőstressz gének működése számos élettani folyamatban szerepet játszik. Ha nehézfém szennyezés fordul elő a vizekben, akkor is szabályozottá válik a működésük, melynek következtében előfordulhat gerincdeformitás. Ha viszont a lárvák, illetve a fiatal egyedek gyorsan változó hőmérsékletnek vannak kitéve, akkor is kialakulhat számos malformáció már a csigolya fejlődés során is. Összefoglalva a HSP gének megfelelő biomarkernek tekinthetők a halak esetében, melyek gyorsan reagálnak a környezet változásaira és a szervezetet ért különböző stresszhatásokra.

ANYAG ÉS MÓDSZER

Mintagyűjtés, RNS izolálás, cDNS átírás és RT-qPCR

A kísérletbe 20db, 268 napos, egy tájfajtába (hajdúszoboszlói pikkelyes) tartozó pontyot (*Cyprinus carpio*) vontunk be, a következő csoportokat kialakítva: 10 db normál és 10 db deformált. A halakat a Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Karának Halbiológiai Laboratóriumában nevelték. A vizsgálatot a Debreceni Egyetem Munkahelyi Állatjóléti Bizottságának irányelvei szerint hagyták jóvá és kiviteleztek a DEMAB/15/2019 regisztrációs számú engedély alapján.

A kísérletbe vont halak mesterséges szaporításból és ugyanazon szülőktől származtak. A kísérletbe vont állomány takarmányozása a halfaj számára optimálisnak tekinthető protokollt követte. A szikzacskó felszívódását, illetve az exogén táplálkozás megkezdését követően a lárvákat 7 napig élő eleséggel (*Artemia nauplius* lárvá) etettük, majd megkezdtuk a száraz tápra történő átszoktatást. A halak takarmányozását a nevelés további szakaszaiban kereskedelmi forgalomban kapható tápra alapoztuk, amely 30%-os nyersfehérje- és 7%-os nyerszsírtartalommal rendelkezett.

A halak nevelése, a keltetéstől a mintavétel végrehajtásáig azonos környezeti, technológiai és takarmányozási feltételek mellett történt.

A csoportok intenzív recirkulációs rendszerekben, 350 literes műanyag tartályokban voltak nevelve, a tartályok mechanikus biofilterrel és UV lámpával voltak ellátva. A halakat naponta 3 alkalommal etették (08:00, 12:00 és 16:00), kereskedelmi forgalomban lévő száraz táppal. A takarmány maradékok és a széklet naponta eltávolításra került. Az oxigén-telítettsége 80% felett, a hőmérséklet $25,05 \pm 0,5$ °C-on volt tartva. A fényperiódus 12 óra világos és 12 óra sötét volt. A víz hőmérséklet és az oldott oxigén naponta ellenőrizve volt HACH HQ30d hordozható mérővel (HACH CO., Loveland, CO, USA). Az NO₂-, NO₃- és NH₄⁺ -koncentrációkat HACH Lange DR/3900 spektrofotométerrel (HACH CO., Loveland, CO, USA) mérték. Az ellenőrzött környezet következtében a kísérletből a környezeti tényezők befolyását kizárhatjuk, hiszen az azonos környezeti feltételek között tartott egyedeknél a gerincdeformitás megjelenésének genetikai okai kerülnek előtérbe.

A mintavétel során az állatok agyvelejéből, hátizomszövetéből, illetve véréből vettünk mintát, amiket RNeasy (Roche) oldatba helyeztük az RNS stabilizálása és védelme érdekében. A folyamat során a teljes szervet homogenizáltuk. A boncolás előtt szegfűszegolajjal végeztünk eutanáziát az egyedeken. A minták

-70 °C-on voltak tárolva a laboratóriumi vizsgálatokig, mely a Debreceni Egyetem Agrár Genomikai és Biotechnológiai Központjában zajlott. Az RNS izolálást a vér esetében az RNeasy Protect Animal Blood Kit (QIAGEN, Hilden, Németország), míg a hátizom és az agyvelő esetében az E.Z.N.A. Tissue RNA Kit (USA) használatával végeztük, követve a gyártók utasításait. Az E.Z.N.A. Tissue RNS Kit kimondottan az állati szövetekből származó teljes RNS izolálására lett kifejlesztve, különösen néhány nehéz rostos szövetre, mint például a vázizom, a szív és az aorta szövet. A minták RNS koncentrációját NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) spektrofotométerrel mértük. A cDNS-re írás a PCR Biosystems qPCRBIO cDNA Synthesis Kit szintetizáló kit alkalmazásával, annak gyártói protokollját követve történt.

Az RT-qPCR vizsgálat során az előírt összetevőkből egy mixet készítettünk, ami egy mintára vonatkoztatva a következő mennyiségeket tartalmazta: 1,3 µl desztillált víz, 0,6 µl forward primer (10µM), 0,6 µl reverse primer (10µM), 5 µl SYBR Green (Applied Biosystems, USA). 7,5 µl mixhez 2,5 µl (2 ng/µl) templát cDNS-t adtunk. Az RT-qPCR-hez 7300 Real Time PCR System-et használtunk, a vizsgálatot kétszeres ismétléssel végeztük el. A kapott ciklusküszöb értékeket (Ct) Pfaffl-módszerrel (Pfaffl, 2001) elemeztük. A számítások elvégzéséhez a Microsoft Excel 2013 (v15.0) programot használtuk. Az elemzések során a HKG (House Keeping Gene), a B2M, vagyis a béta-2-mikroglobulin volt. Az alkalmazott primerek adatait az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat

Az alkalmazott primerek adatai

Gének (1)	Primer szekvenciák (5'→3') (2)	Amplikon hossza (bp) (3)
β-actin2	F: CCATCGGCAATGAGCGTTTC	75
	R: GCACAGCATAAGACTCACCCA	
HSP70	F: CTCAGGCACGTGGAGCATC	90
	R: TGAAAGACAAAGTGACAAGTCCA	
HSP90	F: ACGGATCATGAAAGCCCAGG	104
	R: TGAGAGGATGTTTGGGGTTGAT	

Table 1. Data of the applied primers

Genes (1); Sequence of the primer (2); Length of the amplicon (3)

A boncolás során a teljes gerincoszlop eltávolításra került makro- és mikroelem tartalom vizsgálata céljából. Ezek feldolgozását a Debreceni Egyetem Szervetlen és Analitikai Kémia Tanszéken végezték el. A mintákat kemencében állandó tömegig szárították, és 2x4,0 ml salétromsavval (HNO₂) marták (p.a. 65%). Ezután 1,0 ml hidrogén-peroxidot (H₂O₂) (p.a. 30%) adtak a mintákhoz, amelyeket a mérés előtt kiegészítettek 10 ml-re. A makro- és mikroelem értékeket ezekből az oldatokból mérték egy 5110 VDV Agilent ICP-OES (Agilent, Santa Clara, USA) 5 pontos kalibrációs vonal alkalmazásával.

Minden statisztikai elemzést SPSS 26.0 szoftverrel végeztünk (IBM Corp.,

Armonk, New York, USA). A csoportok közötti különbségek összehasonlítására független mintás T-próbát és Mann-Whitney U-próbát használtunk. A normális eloszlást a Shapiro Wilk teszt segítségével, a szóráshomogenitást pedig Levene tesztjével értékeltük. Ha a szóráshomogenitás nem volt szignifikáns, akkor független mintás T-próbát alkalmaztunk, ha pedig szignifikáns értéket kaptunk, akkor a Welch T-tesztet használtuk.

A génexpresszió és az elemtartalom közötti összefüggések vizsgálatára lineáris regressziós modellt alkalmaztunk. Ha a vizsgált minták mRNS-expressziója vagy elemtartalma nem mutatott normális eloszlást (Shapiro-Wilk teszt esetén), akkor egy nem paraméteres statisztikai tesztet, a Spearman-féle rangkorrelációs tesztet használtuk a kapcsolatok elemzésére.

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

EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

Összesen 20 egyedet vizsgáltunk, kétféle csoportosításban: 10 normál, 10 deformált egyed. Az 1. ábra bemutatja a HSP70 gén relatív kifejeződését a vizsgált szövettípusokban. Az X-tengelyen a szövettípusokat láthatjuk normál és deformált csoportok bontásában, az Y-tengelyen pedig a relatív génexpresszió szintjét. Az 1. ábráról egyértelműen leolvasható, hogy a HSP70 relatív kifejeződésének mértéke deformált halak esetében minden szövettípusban magasabb értéket mutatott. A normál (vér: átlag=1,9; szórás=1,4; hátizom: átlag=1,02, szórás=0,23; agyvelő: átlag=1,03; szórás=0,26) és deformált (vér: átlag=3,64; szórás=7,69; hátizom: átlag=1,45; szórás=0,42; agyvelő: átlag=1,45; szórás=0,74) csoport relatív expressziója között szignifikáns különbséget egyik szövet esetében sem találtunk (vér: $t(4,34) = -2,083$ $p=0,100$; hátizom: $t(10) = -1,882$ $p=0,089$; agyvelő: $t(10) = -1,924$ $p=0,083$). A legszembetűnőbb különbség a vér esetében volt tapasztalható a két csoport között. A vázizomban a HSP70 gyorsan indukálja a normál és káros stressz-ingereket is, beleértve a testmozgást és az akut izomsérüléseket. A HSP70 túlműködése hozzájárul az izomrost integritásának fenntartásához és elősegíti az izom regenerálódását és helyreállítását. Az indukálható HSP70 szintje megemelkedik a vázizomban a különböző zavarok, például a testmozgás és az izom sérülése, valamint az ezekhez az állapotokhoz kapcsolódó izomnövekedés és regeneráció időszakában. Ezzel ellentétben a HSP70 génexpressziója csökken az izom inaktivitása és öregedése során (Senf, 2013). Ahogy az 1. ábra mutatja, a HSP70 felülexpresszált a deformált csoport minden szövettípusában az egészséges halakhoz képest, bár ez a különbség nem volt statisztikailag szignifikáns. Ez abba az irányba mutat, hogy a génnek nagy szerepe lehet a stresszre adott válaszban, és mintegy „védő” szerepben feltűnve, segíthet megőrizni az izomfunkciót, például a hátizom normális működése érdekében.

Számos eredmény ismert az egyes stressz-válasz gének expressziós szintjének növekedése kapcsán. A gerincesek korai embrionális fejlődésének vizsgálatához HSP47, HSP70 és HSP90 géncsaládok tagjait klónozták. Az ilyen típusú vizsgálatokra leggyakrabban zebrahalat (*Danio rerio*) használnak (Yeyati és mtsai, 2007; Du és mtsai, 2008; Van Gennip és mtsai, 2018). Számos hősokk-gén komplex mintákat mutat a konstitutív és indukálható expresszióban mind gerinctelenek,

mind gerincesek korai embrionális fejlődése során (Chen és mtsai, 2005). Amint az 1. ábrán látható, a deformitással érintett hátizomban magasabb szintű HSP70 génkifejeződést észleltünk, mint a normál csoport esetében. Ennek egyik lehetséges magyarázata lehet, hogy a sérült hőstressz fehérjék további HSP70 hőstresszfehérje aktivitást váltanak ki, és a halak szervezete így reagál a testüket ért behatásokkal szemben.

Az általunk tapasztalthoz hasonlóan, emelkedett HSP70 génexpressziós szintet észleltek szívárványos pisztrángok hőstressz vizsgálata során környezeti tényezőkkel kapcsolatban. A környezeti szennyeződések a hőstressz fehérjéjének szignifikáns kifejeződését is előidézik. A szívárványos pisztrángból származó elsődleges vizsgálati eredmények alapján kimutatták, hogy a HSP70 több szennyezőanyag jelenlétében magasabb génexpressziós szintet mutat (Iwama és mtsai, 1998). Ezek az eredmények, miszerint az állatokat ért különböző forrású stresszhatások növelik a HSP70 relatív génexpressziójának szintjét, összecsengenek az általunk észlelt eredményekkel, azzal a különbséggel, hogy esetünkben a gerinc deformitása lehetett az indukáló stresszhatás.

Machado és mtsai, (2017) tanulmányában a HSP70 és a p53 géneken keresztül vizsgálták a közönséges ponty embriók viselkedési reakcióit magasabb hőmérséklet hatására. A HSP70 és a p53 génexpressziós szint növekedése volt megfigyelhető a vizsgált összes szövetben, a kontrollcsoporthoz viszonyítva, jelezve a fehérjék funkcionális szerkezetének csökkenését és a DNS-károsodását a ponty embriókban. Ez a tanulmány arra utalt, hogy a magasabb hőmérsékleti kezelés viselkedési és fehérje kifejeződési változásokat okoz a halakban, és ezek a változások befolyásolhatják a faj túlélését. A HSP70 képes megvédeni a sejteket a stressztől. A halak különösen érzékenyek a környezeti felmelegedésre, mivel nincsen hőszabályozásuk, a testhőmérsékletük kapcsolódik a környezet hőmérsékletéhez, azaz poikiloterm állatok. Machado és mtsai, (2017) vizsgálatában a magasabb hőmérsékleten nevelt csoportokban a HSP70 génexpresszió a citoplazmában és az izom magjaiban szignifikánsan magasabb volt. A p53 és a HSP70 génexpresszió szinte észlelhetetlen volt a 25 °C-on tartott halakban, amik a kontroll csoportot jelentették (Machado és mtsai, 2017). Ahogy az 1. ábrán is megfigyelhető, vizsgálatunkban a HSP70 hőstresszfehérje génexpressziós szintje magasabb értéket mutatott a deformált csoportnál minden vizsgált szövettípusban, mint a normál csoport esetében, ugyanakkor ez a különbség nem volt statisztikailag is alátámasztható. Míg a fenti példában a kezelési csoportok között az eltérő környezeti hőmérséklet volt a különbség, a mi vizsgálatunk során a környezet azonos volt a normál és deformált csoportok esetében. Tehát stresszfaktorként a deformált gerinc jelentkezett, ami folyamatos nehézséget, terhelést jelent az érintett állatoknak, ezáltal „bekapcsolhatta és folyamatosan működtethette” szervezetük védelmi mechanizmusát. Ez energiát vonhat el a szervezet normál működésétől, vagy másként fogalmazva többlet energiát igényel az állattól. A fentiek tükrében elképzelhető, hogy a gerincdeformitás jelentette stresszhatások növelhetik a HSP70 gén kifejeződésének mértékét is.

A 2. ábrán láthatjuk a HSP90 hőstresszfehérje gén relatív kifejeződésének mértékét a vizsgált szövettípusokban. A HSP90 hőstresszfehérje gén expressziójának mértéke vér és agyvelő szövettípusban alacsonyabb értéket mutatott a deformált halak esetében, mint a normál csoportnál, viszont hátizom szövettípusban a defor-

1. ábra HSP70 relatív kifejeződése a vizsgált szövettípusokban

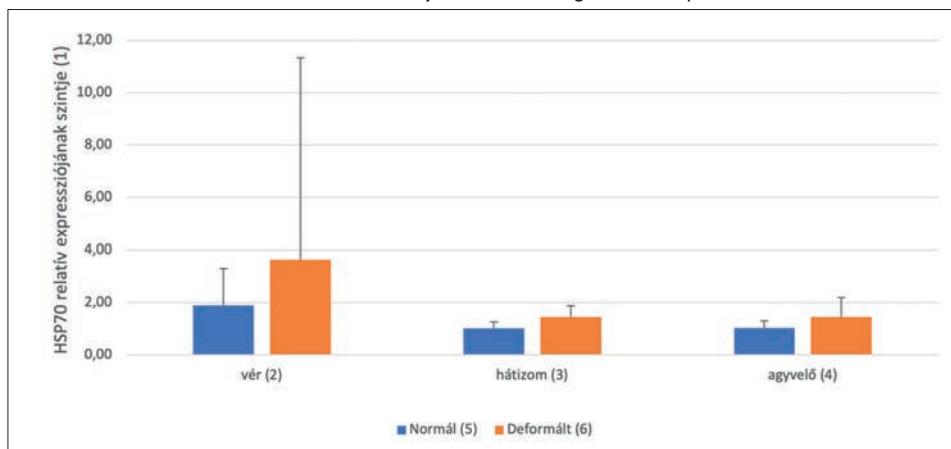


Figure 1. Relative expression level of HSP70 in each studied tissue types

Relative expression level of HSP70 (1); blood (2); back muscle (3); brain (4); normal group (5); deformed group (6)

mált csoport értéke volt magasabb. A normál (vér: átlag=2,1; szórás=1,9; hátizom: átlag=1,08; szórás=0,42; agyvelő: átlag=1,45; szórás=1,63) és deformált (vér: átlag=1,76; szórás=2,2; hátizom: átlag=1,34; szórás=0,6; agyvelő: átlag=1,04; szórás=0,74) csoport relatív expressziója között statisztikailag szignifikáns különbséget egyik szövet esetében sem találtunk (vér: $t(6,38) = -2,32$ $p = 0,057$; hátizom: $t(10) = 1,208$ $p = 0,255$; agyvelő: $t(10) = -1,857$ $p = 0,093$). A HSP90 fehérjék környezeti szempontból érzékeny chaperonok, amelyeket gerincesek többszörös lókuszaiban kódolnak. Normál körülmények között elősegítik az újonnan szintetizált fehérjék hajtogatódását, valamint a szabályozható molekulák, például kinázok és szteroid hormon receptorok kísérését. Mutáció vagy környezeti stressz hatására további HSP90-kapacitás szükséges az újonnan destabilizált fehérjék megtartásához, magasabb expressziós szintet eredményezve. E kettős szerep következménye, hogy a HSP90 funkcionálisan korlátozhatóvá válik, annak ellenére, hogy stressz hatására indukálódik (Yeyati és mtsai, 2007). Vizsgálatunkban, ahogyan a 2. ábrán is megfigyelhető, vér és agyvelő szövettípusban az ellenkező eset bekövetkezése valószínűsíthető, mivel a génexpressziós szint alacsonyabb értéket mutat a deformált csoportnál. Ez ellentmondásban van az előbb említettekkel, és ennek oka talán az lehet, hogy a deformált egyedek vér és agyvelő szöveteiben zavar léphetett fel vagy pedig ezekben a szövetekben nem jelentkezett stresszhatásként a gerincdeformitás, nem volt egyértelmű kapcsolat közöttük. A hátizom viszont közelebb van a gerinc-hez és jobban kitett a deformált gerinc közvetlen hatásainak, így abban nem volt számunkra meglepő a magasabb expressziós szint HSP90 hőstresszfehérje gén esetében, amit a stresszre adott válasz jeleként is értelmezhetünk.

Egy vizsgálat kimutatta, hogy a HSP90 α kifejezetten a zebadanió (*Danio rerio*) embriók vázizomzatában fejeződik ki (Du és mtsai, 2008). A kutatás szerint a zebadanió két HSP90 α gént tartalmaz, amelyek hasonló génexpressziós mintázattal rendelkeznek. A HSP90 α 1 kulcsszerepet játszik a miofibrillum szerelvényben,

ami a vázizom izomroston belüli összehúzódásra képes alapegysége. A HSP90 α 1 génexpressziójának csökkentése a vázizomban mozgásképtelen embriókhoz vezetett. A funkcionális vizsgálatok azt mutatták, hogy a HSP90 α 1 génexpresszió gátlása erősen megzavarta az izom fejlődését, miközben a HSP90 α 2 blokkolása nem volt hatásos (Du és mtsai, 2008). Ezekből a kutatási eredményeinkből arra a következtetésre juthatunk, hogy a hátizomban a HSP90 hősokkfehérjéjén expressziós szintjének megemelkedése a deformált gerinc hatásaiból adódik, a sejt- és az izomfunkció stabilizálásának érdekében.

A HSP90 hőstresszfehérje gén fontos szerepet játszik a patogén transzformáció szabályozásában. A rosszindulatú betegségek jellemző funkciói mellett számos laboratóriumi vizsgálat utal arra, hogy a HSP90 részt vesz a neuronális fehérjék funkcionális stabilitásának fenntartásában, akár mutáns, akár túlaktivált az adott fehérje, lehetővé téve és fenntartva a mérgező aggregátumok felhalmozódását. Ezen túlmenően a HSP90 szabályozza az 1-es (HSF-1) transzkripció faktor fő szabályozójánját, melyet a sejtek a védelemhez használnak, ha stresszes körülményeknek vannak kitéve. Ezek miatt a biológiai funkciók miatt HSP90 gátlást javasolnak, mint a neurodegeneratív betegségek kettős terápiás módja (Luo és mtsai, 2010). A HSP90 szerepet játszhat a normál izomképzés során, segíti a fehérjék működésének stabilitását, ami alátámaszthatja a vizsgálatunk során észlelt megemelkedett génexpressziós szintet a hátizom szövettípusban.

A HSP90 védő szerepe a gerinces állatokban előforduló öröklődő fejlődési rendellenességek változó penetranciájának vagy súlyosságának tudható be. A HSP90 inhibitor szinteket zebradánióban határozták meg. A HSP90-gátlás csökkentheti a zebrahal fejlődési stabilitását, a vizsgálatok azt mutatják, hogy a HSP90 funkció enyhe zavarása a kritikus fejlődési szakaszokban, számos fejlődési rendellenesség változó penetranciáját és expresszivitását támasztja alá, ahol a genotípus és a környezet közötti kölcsönhatás is fontos szerepet játszik.

2. ábra HSP90 relatív kifejeződése a vizsgált szövettípusokban

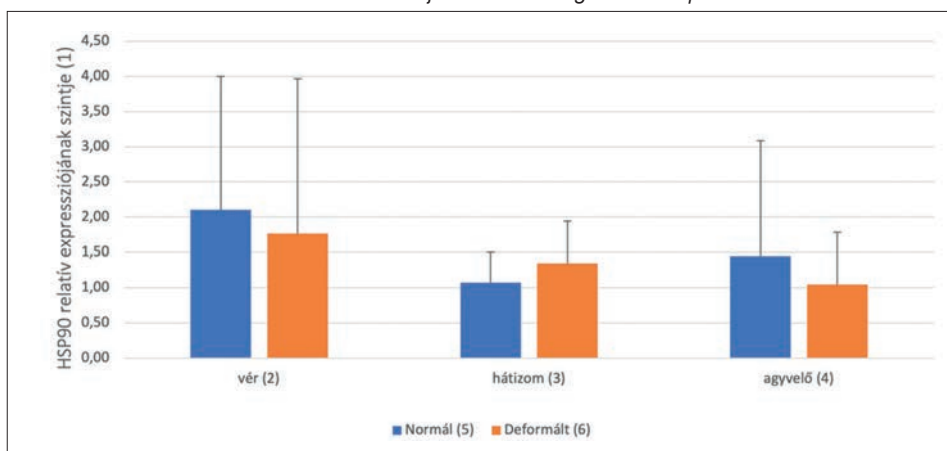


Figure 2. Relative expression level of HSP90 in each studied tissue types

Relative expression level of HSP90 (1); blood (2); back muscle (3); brain (4); normal group (5); deformed group (6)

Stresszhelyzetekben a HSP90 hőstresszfehérje gén expressziós szintjének csökkentését vélték felfedezni. Az eredmények azt mutatták, hogy a gerinces állatokban a HSP90 képes a diszkrét kvalitatív morfológiai jellemzők fenotípusos variabilitását pufferelni, különösen aszimmetrikus egyedeket eredményezve (Yeyati és mtsai, 2007). Tehát a 2. ábrán látható deformált csoportok csökkent HSP90 relatív génexpressziós értékét magyarázhatják a fenti információk, miszerint a stresszhelyzetekből adódó külső elváltozások összefüggésben állnak az alacsonyabb HSP90 hőstresszfehérjéjén expressziós szinttel agyvelő és vér szövettípusban. Ennek igazolása azonban kiterjedtebb, további szöveteket és magasabb elemszámot alkalmazó vizsgálatokat igényel.

A relatív génexpresszió szintjei és a gerincoszlop elemtartalma közötti kapcsolatok

A 2. táblázatban az mRNS-szintek és a gerinc makro- és mikroelem tartalmának statisztikailag szignifikáns kapcsolatai láthatóak a lineáris regresszió és a Spearman-féle korreláció alapján. A halakban az ásványi anyagoknak is fontos szerepük van az ozmoregulációban és a vázképzésben, valamint a köztes anyagcsere folyamatokban is. Viszonylag nehéz tanulmányozni a halak megfelelő és káros ásványi szükségleteit, de rendkívül érdemes, ugyanis egyes ásványi anyagok nagyon kis mennyiségben, más ásványi anyagok pedig jelentős mennyiségben szükségesek számos élettani folyamathoz (El-Sadaawy és mtsai, 2013; Sfakianakis és mtsai, 2015). A takarmányozási hibák súlyos ásványianyag-hiányhoz vezethetnek, ami a halak ellenálló képességének a csökkenéséhez vagy akár csontváz deformációjához is vezethet számos egyéb betegségen kívül (Koumoundouros és mtsai, 2002). Az ilyen típusú összefüggés vizsgálatokra pedig a korreláció vizsgálatok a legalkalmasabbak. A táblázatban látható, hogy több esetben kimutatható összefüggés volt az egyes gének különböző szövetekben mért relatív expressziója és a gerincoszlop ásványianyag tartalma között, továbbá minden esetben erős kapcsolat volt a változók között. Összesen 10 esetben volt szignifikáns kapcsolat, mely során legtöbbször a hátizom állt kapcsolatban a gének expressziójával és a gerinc elemtartalmával (7 eset), melyből csak 2 esetben fordult elő kapcsolat a normál csoportban, a többi eset mind a deformált csoportokra volt jellemző. Legkevesebb alkalommal pedig az agyvelő állt kapcsolatban a gének expressziójával (1 eset). A hátizomban a HSP70 erős negatív korrelációban állt a gerincoszlop réz tartalmával a deformált csoportban ($r=-0,901$; $p=0,014$), illetve a hátizomban szintén negatív korreláció mutatkozott a foszforral a deformált csoportban a HSP70 génben ($r=-0,883$; $p=0,020$). A többi esetben az összefüggések között pozitív korreláció volt. A normál csoport hátizom szövetében például a HSP70 expressziója és a kálium koncentráció álltak erős, pozitív kapcsolatban ($r=0,811$; $p=0,050$). Illetve magas, pozitív korrelációt detektáltunk a normál csoport hátizom szövet HSP90 gén expressziója és a gerincoszlop kálium tartalma között ($r=0,970$; $p=0,001$). A HSP90 gén a deformált csoportban magas korrelációt mutatott vérszövetben a káliummal ($r=0,829$; $p=0,042$). A deformált csoportban mért legalacsonyabb regressziós érték az agyvelő HSP90 mRNS szintje és a gerinc vastartalma között volt ($R^2=0,668$; $p=0,047$). A legmagasabb regresszió pedig a deformált csoport hátizom szövetében a HSP70 kifejeződés és a kalcium között fordult elő ($R^2=0,780$, $p=0,020$).

2. táblázat

Az mRNS-szintek és a gerincoszlop mikro- és makroelem-tartalmának kapcsolatai lineáris regresszió és a Spearman-féle korreláció alapján

				Lineáris Regresszió (5)			Spearman féle korreláció (6)	
				p-érték (7)	R ² (8)	Korrigált R ² (9)	rho korrelációs együttható (10)	p-érték (7)
Szövet (1)	Gén (2)	Elem (3)	Csoport (4)					
hátizom (11)	HSP70	Ba	deformált (14)	0,036	0,706	0,632		
hátizom	HSP70	Ca	deformált	0,020	0,780	0,725		
hátizom	HSP70	Sr	deformált	0,035	0,713	0,641		
agyvelő (12)	HSP90	Fe	deformált	0,039	0,695	0,618		
hátizom	HSP70	Cu	deformált				-0,901	0,014
hátizom	HSP70	K	normál (15)				0,811	0,050
hátizom	HSP70	P	deformált				-0,883	0,020
vér (13)	HSP90	K	deformált				0,829	0,042
hátizom	HSP90	K	normál				0,970	0,001
vér	HSP90	S	normál				0,819	0,046

Table 2. Relationship between mRNA levels and spinal micro- and macroelement content based on Linear Regression and Spearman Correlation

tissue (1); gene (2); element (3); group (4); Linear Regression (5); Spearman's correlation (6); p-value (7); R²-value (8); Adjusted R-squared (9); rho Correlation Coefficient (10); back muscle (11); brain (12); blood (13); deformed group (14); normal group (15)

KÖVETKEZTETÉS

Összességében elmondható, hogy a két vizsgált hőstressz gén működése szövetenként eltérő volt. A HSP70 expressziója a deformált csoportban minden esetben magasabb értéket mutatott a normál csoporthoz képest, ugyanakkor ezek a különbségek nem voltak statisztikailag szignifikánsak. Az eredményeket az irodalmi adatokkal összevetve elképzelhető, hogy a deformált egyedek esetében elindulhatott a génnek a biomarker funkciója, így a megjelenő egészségügyi károsodás jelzése során változott a génexpresszió mértéke is. Illetve a megnövekedett relatív expressziós szintet okozhatta az is, hogy a sérült fehérjék további HSP70 aktivitását váltották ki.

A HSP90 gén relatív expressziójának mértéke a vér és agyvelő szövetekben alacsonyabb értékeket mutatott a deformált csoportban a normál csoporthoz képest. A hátizom szövetben viszont a deformált csoport értéke volt magasabb. A HSP90 génnek fontos szerepe van a normál izomképzésben, illetve segíti a fehérjék funkciójának stabilitását, ezért az általunk kapott eredmény összhangban volt előzetes várakozásainkkal. A vér és agyvelő szövettípus esetében előforduló alacsonyabb kifejeződési szint pedig a szignál transzdukció, protein-tirozin kináz

receptorának nem megfelelő működéséből adódhat, melyek hozzájárulnak a gerincoszlop deformáltságához. Fontos kiemelni, hogy egyik vizsgált gén relatív expressziója esetében sem sikerült szignifikáns mértékű különbségeket kimutatni a vizsgálati csoportok között. A statisztikailag igazolható különbség hiányára egyaránt magyarázat lehet a biológiai kapcsolat hiánya és a jelen vizsgálatban alkalmazott alacsony elemszám is. Ahogy a bemutatott irodalmi adatok alátámasztják, a biológiai kapcsolat nem zárható ki, így a kérdés eldöntése érdekében javasolt lenne a vizsgálat sorozat megismétlése nagyobb elemszám alkalmazásával.

A gerincoszlop makro- és mikroelem tartalmának vizsgálata izgalmas eredményeket szolgáltatott. A legtöbb kapcsolatban a hátizom volt érintett, ami megfelelt az előzetes várakozásainknak, mivel a hátizom a legközelebb elhelyezkedő szövet a gerincoszlophoz, amiben pedig a makro-, illetve mikroelemek nagy hányada raktározódik. Érdekes volt, hogy csak 2 esetben volt szignifikáns kapcsolat a normál csoportban, a többi szignifikáns kapcsolat esetében a deformált csoport volt érintett. Az elemek tekintetében a kálium volt a leggyakoribb előforduló makroelem, mely a hátizom és vér HSP génjeinek relatív expressziójával állt gyakran igazolható összefüggésben. Mindhárom esetben erős pozitív korreláció volt a jellemző. A sejtek normál működéséhez szükséges az, hogy az őket körülvevő membrán két oldalán elektromos töltés alakuljon ki, mely elsősorban a kálium megoszlásától függ (Kowey, 2002). Éppen ezért a kálium kulcsfontosságú az olyan szövetekben, melyekre a gyors elektromos potenciál változás a jellemző, tehát például az ideg és izomszövetek működéséhez elengedhetetlen. Továbbá fontos a szervezet vércukorszint szabályozásában is (Kowey, 2002), így ezzel magyarázható lehet a deformált csoportban fellépő magas korrelációja a vérszövetben. A továbbiakban pedig a normál csoport esetében volt összefüggés a hátizom és a kálium között, ami jelentheti azt is, hogy az egészséges egyedekben működött megszokott módon a kálium. Partridge és Lymbery 2008-ban sós talajvízben történő kálium-kiegészítés hatásait vizsgálták az ázsiai sügér (*Lates calcarifer*), vagy másnéven barramundi halakban. A különböző koncentrációjú ozmotikus közegekben vizsgálták a halak növekedésre, illetve fiziológiai reakciókra adott válaszait. Hígítatlan talajvizet (45 ppt) nem használtak a kísérlet során, ugyanis az az egyedek nagyfokú mortalitását okozta egy korábbi kísérletben (Partridge és Creeper, 2004). Összesen 4 fokozatot állítottak be a kálium kiegészítés szempontjából, ennek megfelelően hígították is a sós talajvizet klómentesített csapvízzel. Az 50%-os kálium-egyenértékű vízben a halak 4 hétig éltek, de a testsúlyban nagy fogyás következett be. A 75%-os és 100%-os egyenértékű vízben a halak hízást és jó kondíciót mutattak. A vérplazma kálium homeosztázisát ezekben a halakban a vázizomzat puffereelésével tartották fenn. Az említett kísérletek alátámasztják a kálium fontosságát, ugyanis Partridge és Creeper 2004-ben végrehajtott kísérlete során a kórszövettani vizsgálat a vázizomzat súlyos degenerációját és nekrozízisát, a sejtek kifejezett hiperpláziáját és a vese tubuláris nekrozízisát tárta fel. Arra a következtetésre jutottak, hogy a nagyfokú mortalitás fő oka a víz alacsony káliumszintje által kiváltott csontrendszeri myopathia volt (Partridge és Creeper, 2004). Mivel az egyedek ellenőrzött körülmények között, nem szennyezett területen és vízben voltak tartva, így valószínűleg ezért nem alakultak ki egyéb, különleges mintázatok a makro- és mikroelemek tekintetében.

Eredményeink rávilágítanak a hőstressz gének komplex élettani szerepére és a gerincdeformitás genetikai hátterének bonyolult összefüggéseit is sejtetik. Javasoljuk további vizsgálatok elvégzését a témában, melyek az itt felvetett kutatási irányok kiteljesítését szolgálják. A különböző hőstressz gének relatív expresszójának és a gerincdeformitás összefüggéseinek igazolására nagyobb elemszámú, és a jelen tanulmányban bemutatott két HSP génen túl további hőstressz gének bevonása indokolt lenne. Hasznos információkkal szolgálhatna a génexpressziós eredmények és a hátizom szövet különböző elemtartalmakra vonatkozó koncentrációinak összevetése, tehát a két vizsgálatípust egyazon szövetben elvégezni, az esetleges közvetlen kapcsolatok feltárására. Megítélésünk szerint ezek a vizsgálatok a jövőben az intenzív haltermelő rendszerek számára is adaptálható gyakorlati eredmények megszületéséhez vezethetnének a jelentős gazdasági károkat okozó gerincdeformitás jelenségének visszaszorítása érdekében.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

IRODALOMJEGYZÉK

- Ahmed, E. O. – Abd-Alrhman, A. M. – Sheham–Ebrahim, J. – Heba, H. Adm. (2017): Proximate and mineral composition of some commercially important fishes in Jebel Awlia reservoir, Sudan. –IJFA, 3. 51-57. DOI: <https://doi.org/10.4314/tfb.v25i1.5>
- Bagi, Z. – Balog, K. – Tóth, B. – Fehér, M. – Bársny, P. – Baranya, I. E. – Harang, I. S. – Mohammad, R. A. – Hegedűs, B. – Stündl, L. – Kusza, Sz. (2022): Genes and elements involved in the regulation of the nervous system and growth affect the development of spinal deformity in *Cyprinus carpio*. PLoS ONE 17(4): e0266447. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266447>
- Bildik, A. – Asıcı Ekren, G. S. – Akdeniz, G. – Kiral, F. (2019): Effect of environmental temperature on heat shock proteins (HSP30, HSP70, HSP90) and IGF-I mRNA expression in *Sparus aurata*. Iran. J. Fish., 18. 1014-1024. DOI: <https://doi.org/10.22092/ijfs.2018.116979>
- Boglione, C. – Gisbert, E. – Gavaia, P. – Witten, E. P. – Moren, M. – Fontagné, S. – Koumoundouros, G. (2013): Skeletal anomalies in reared European fish larvae and juveniles. Rev. Aquac., 5. S121-S167. DOI: <https://doi.org/10.1111/raq.12016>
- Bostock, J. – Lane, A. – Hough, C. – Yamamoto, K. (2016): An assessment of the economic contribution of EU aquaculture production and the influence of policies for its sustainable development. Aquac. Int., 24. 699-733. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10499-016-9992-1>
- Chen, B. – Piel, W. H. – Gui, L. – Bruford, E. – Monteiro, A. (2005): The HSP90 family of genes in the human genome: insights into their divergence and evolution. Genomics., 86. 627-37. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2005.08.012>
- Davies, P. H. – Goettl, Jr. J. P. – Sinley, J. R. – Smith, N. F. (1976): Acute and chronic toxicity of lead to rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in hard and soft water. Water Res., 10. 199-206. DOI: [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(76\)90128-7](https://doi.org/10.1016/0043-1354(76)90128-7)
- De Jonge, T. (2001): A gerinc *sagittalis* görbületi deformitásainak műtéti kezelése, különös tekintettel a *scoliosis*hoz társuló *sagittalis* elváltozásokra. Doktori értekezés. Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar, Pécs, 106.

- Demény, F. – Lévai, T. – Zöldi, L. G. – Fazekas, G. – Hegyi, Á. T. – Urbányi, B. – Müller, T. (2009): Különböző takarmányok hatása a rétcsík lárvák (*Misgurnus fossilis*) növekedésére és megmaradására intenzív körülmények között. Halászat, 102. 150-156.
- Demény, F. – Sudár, G. – Trenovszki, M. – Kucska, B. – Hóvári, J. – Szabó, G. – Molnár, T. – Hegyi, Á. – Urbányi, B. – Müller, T. (2011): Különböző takarmányok hatása a széles kárász (*Carassius carassius* L.) termelési mutatóira laboratóriumi körülmények között. Állattenyésztés és Takarmányozás, 60. 29-45.
- Du, S. J. – Li, H. – Bian, Y. – Zhong, Y. (2008): Heat-shock protein 90alpha1 is required for organized myofibril assembly in skeletal muscles of zebrafish embryos. P. Natl. Acad. Sci. USA., 105. 554-559. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.0707330105>
- Eissa, A. – Moustafa, M. – El-Husseiny, I. – Saeid, S. – Saleh, O. – Borhan, T. (2009): Identification of some skeletal deformities in freshwater teleosts raised in Egyptian aquaculture. Chemosphere., 77. 419-425. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.06.050>
- El-Sadaawy, M. M. – El-Said, G. F. – Sallam, N. A. (2013): Bioavailability of heavy metals in freshwater Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus* Linnaeus, 1758): Potential risk to fishermen and consumers. J. Environ. Sci. Health-B, 48. 402-409. DOI:10.1080/03601234.2013.742719
- Füst, Gy. – Prohászka, Z. – Cervenak, L. (2003): A hősokkfehérjék immunológiai tulajdonságai és szerepük az érelmeszesedés keletkezésében. Magyar Tudomány, 48. 430-439.
- Galt, N. J. – McCormick, S. D. – Froehlich, J. M. – Biga, P. R. (2016): A comparative examination of cortisol effects on muscle myostatin and HSP90 gene expression in salmonids. Gen. Comp. Endocrinol., 237. 19-26. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.07.019>
- Gjerde, B. – Pante, M. – Baeverfjord, G. (2005): Genetic variation for a vertebral deformity in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture, 244. 77-87. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.12.002>
- Hansen, Ø. J. – Puvanendran, V. (2010): Fertilization success and blastomere morphology as predictors of egg and juvenile quality for domesticated Atlantic cod, *Gadus morhua*, broodstock. Aquac. Res., 41. 1791-1798. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2010.02506.x>
- Iwama, G. – Philip, T. T. – Forsyth, R. B. – Vijayan, M. (1998): Heat shock expression in fish. Rev. Fish Biol. Fish., 8. 35-56.
- Kasprzak, R. – Ostaszewska, T. – Wagner, B. (2018): The effect of feeding commercial diets on the development of juvenile crucian carp (*Carassius carassius* L.). Part 1: Skeletal deformations. Aquac. Nutr., 1-10. DOI: <https://doi.org/10.1111/anu.12831>
- Kocour, M. – Linhart, O. – Vandeputte, M. (2006): Mouth and fin deformities in common carp: Is there a genetic basis? Aquac. Res., 37. 419-422. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2005.01425.x>
- Koumoundouros, G. – Maingot, E., Divanach, P. – Kentouri, M. (2002): Kyphosis in reared sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.): ontogeny and effects on mortality. – Aquaculture, 209. 49-58. DOI:10.1016/S0044-8486(01)00821-3
- Kowey, P. R. (2002): The Role of Potassium. Med. Sci. Symp. Ser., 151-157. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1061-1_18
- Kužir, S. – Malenčić, L. – Stanin, D. – Vukičević, T. – Alić, I. – Gjurčević, E. (2015): Description of head deformities in cultured common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus, 1758). Vet. Arh., 85. 437-449.
- Lavado, R. – Shi, D. – Schlenk, D. (2012): Effects of salinity on the toxicity and biotransformation of L-selenomethionine in Japanese medaka (*Oryzias latipes*) embryos: mechanisms of oxidative stress. Aquat. Toxicol., 108. 18-22. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.07.001>
- Luo, W. – Sun, W. – Taldone, T. – Rodina, A. – Chiosis, G. (2010): Heat shock protein 90 in neurodegenerative diseases. Mol. Neurodegener., 5. 24. DOI: <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-24>
- Machado, A. – Cardoso, C. – Priscila, V. S. – Costa, E. – Vignardi, C. – Hasue, F. – Viadanna, P. H. – Santos, D. – Yasumaru, F. – Marion, C. – Gomes, V. – Ngan, P. (2017): Lethal thermal maximum temperature induces behavioral responses and protein expressions (Hsp70 and p53) in juvenile common carp (*Cyprinus carpio* Linnaeus). Pan-Am. J. Aquat. Sci., 12. 295-309.

- Madsen, L. – Dalsgaard, I. (1999): Vertebral column deformities in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 171. 41-48. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0044-8486\(98\)00427-x](https://doi.org/10.1016/s0044-8486(98)00427-x)
- Molnár, K. (2003): Halbetegségek. Magyar Országos Horgász Szövetség, Budapest, 95.
- Muramoto, S. (1981): Vertebral column damage and decrease of calcium concentration in fish exposed experimentally to cadmium. *Environ. Pollut. A.*, 24. 125-133. DOI: [https://doi.org/10.1016/0143-1471\(81\)90074-X](https://doi.org/10.1016/0143-1471(81)90074-X)
- Olsvik, P. A. – Brattås, M. – Lie, K. K. – Goksøyr, A. (2011): Transcriptional responses in juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*) after exposure to mercury-contaminated sediments obtained near the wreck of the German WW2 submarine U-864, and from Bergen Harbor, Western Norway. *Chemosphere*, 83. 552-563. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12>
- Partridge, G. J. – Creeper, J. (2004): Skeletal myopathy in juvenile barramundi, *Lates calcarifer* (Bloch), cultured in potassium-deficient saline groundwater. *J. Fish. Dis.*, 27. 523-530. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2761.2004.00567.x>
- Partridge, G. J. – Lymbery, A. J. (2008): The effect of salinity on the requirement for potassium by barramundi (*Lates calcarifer* (Bloch)) in saline groundwater. *Aquaculture*, 278. 163-169.
- Pfaffl, M. V. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29. e45-e45. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Printzi, A. – Kourkouta, C. – Fragkoulis, S. – Dimitriadi, A. – Geladakis, G. – Orfanakis, M. – Mazurais, D. – Zambonino-Infante, J.-L. – Koumoundouros, G. (2021): Balancing between *Artemia* and microdiet usage for normal skeletal development in zebrafish (*Danio rerio*). *J. Fish Dis.*, 44. 1689-1696. <https://doi.org/10.1111/jfd.13487>
- Pyz-Lukasik, R. – Chalabis-Mazurek, A. (2019): Content of macro-and microelements in the muscles of grass carp, bighead carp, siberian sturgeon and wels catfish from eastern Poland. *J. Elem.*, 24. 221-232.
- Rajeshkumar, S. – Munuswamy, N. (2011): Impact of metals on histopathology and expression of HSP 70 in different tissues of Milk fish (*Chanos chanos*) of Kaattupalli Island, South East Coast, India. *Chemosphere*, 83. 415-421. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12>
- Roberts, R. J. (2012): Fish Pathology. Fourth Edition. John Wiley & Sons, 591.
- Sassi, A. – Darias, M. J. – Said, K. – Messaoudi, I. – Gisbert, E. (2012): Cadmium exposure affects the expression of genes involved in skeletogenesis and stress response in gilthead sea bream larvae. *Fish. Physiol. Biochem.*, 39. 649-659. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10695-012-9727-9>
- Senf, S. M. (2013): Skeletal muscle heat shock protein 70: diverse functions and therapeutic potential for wasting disorders. *Front. Physiol.*, 4. 330.
- Sfakianakis, D. G. – Georgakopoulou, E. – Papadakis, I. E. – Divanach, P. – Kentouri, M. – Koumoundouros, G. (2006): Environmental determinants of haemallordosis in European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 254. 54-64. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2005.10.028>
- Sfakianakis, D. G. – Renieri, E. – Kentoruri, M. – Tsatsakis, A. M. (2015): Effect of heavy metals on fish larvae deformities: A review. *Environ. Res.*, 137. 246-255. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.12.014>
- Shefat, S. H. T. – Karim, M. D. A. (2018): Nutritional diseases of fish in aquaculture and their management: A Review. *Acta Sci. Pharm. Sci.*, 2. 50-58.
- Truman, A. W. – Millson, S. H. – Nuttall, J. M. – Mollapour, M. – Prodromou, C. – Piper, P. W. (2007): In the yeast heat shock response, Hsf1-directed induction of Hsp90 facilitates the activation of the Slt2 (Mpk1) mitogen-activated protein kinase required for cell integrity. *Eukaryot. Cell.*, 6. 744-752. DOI: <https://doi.org/10.1128/EC.00009-07>
- Vagsholm, I. – Djupvik, H. O. (1998): Risk factors for spinal deformities in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J. Fish. Dis.*, 21. 47-53. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2761.1998.00069.x>
- Van Gennip, J. L. M. – Boswell, C. W. – Ciruna, B. (2018): Neuroinflammatory signals drive spinal curve formation in zebrafish models of idiopathic scoliosis. *Sci. Adv.*, 4. e1781. DOI: <https://doi.org/10.1126/sciadv.aav1781>

- Vijayan, M. M. C. – Pereira, G. – Kruzynski, G. – Iwama, K. (1998): Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids. *Aquat. Toxicol.*, 40. 101-108. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(97\)00057-X](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(97)00057-X)
- Wargelius, A. – Fjellidal, P. G. – Hansen, T. (2005): Heat shock during early somitogenesis induces caudal vertebral column defects in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Dev. Genes Evol.*, 215. 350-357. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00427-005-0482-0>
- Wolnicki, J. – Myszkowski, L. – Korwin-Kossakowski, M. – Kamiński R. – L. Stanny, A. (2006): Effects of different diets on juvenile tench, *Tinca tinca* (L.) reared under controlled conditions. *Aquacult. Int.* 14, 89-98 DOI: <https://doi.org/10.1007/s10499-005-9017-y>
- Yang, J. – Nune, M. – Zong, Y. – Zhou, L. – Liu, Q. (2015): Close and Allosteric Opening of the Polypeptide-Binding Site in a Human Hsp70 Chaperone BiP. *Structures*, 23. 2191-2203. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.10.012>
- Yeyati, P. L. – Bancewicz, R. M. – Maule, J. – van Heyningen, V. (2007): Hsp90 selectively modulates phenotype in vertebrate development. *Plos Genet.*, 3. 3. e43. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030043>
- Yokoyama, H. – Freeman, M. – Itoh, N. – Fukuda, Y. (2005): Spinal curvature of cultured Japanese mackerel (*Scomber japonicus*) associated with a brain myxosporean, *Myxobolus acanthogobii*. *Dis. Aquat. Org.*, 66. 1-7. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao066001>
- Yoshimune, K. – Yoshimura, T. – Nakayama, T. – Nishino, T. – Esaki, N. (2002): Hsc62, Hsc56, and GrpE, the third Hsp70 chaperone system of *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 293. 1389-1395. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00403-5](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00403-5)

Érkezett: 2022. március

Szerzők címe: Lengyel A. K.
 Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar
 Authors' address: University of Debrecen Faculty of Science and Technology
 H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1.
lengyel.angi@gmail.com

Balog K. – Hegedűs B.
 Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola,
 Agrár Genomikai és Biotechnológiai Központ
 Doctoral School of Animal Science, University of Debrecen,
 Centre for Agricultural Genomics and Biotechnology, Faculty of Agricultural and
 Food Sciences and Environmental Management, University of Debrecen
 H-4032 Debrecen, Böszörményi út 138.
 H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

Bagi Z. – Kusza Sz.
 Debreceni Egyetem Agrár Genomikai és Biotechnológiai Központ
 Centre for Agricultural Genomics and Biotechnology, Faculty of Agricultural and
 Food Sciences and Environmental Management, University of Debrecen
 H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

Baranyai E.

Debreceni Egyetem Természettudományi és Technológiai Kar, Kémiai Intézet
Department of Inorganic and Analytical Chemistry, Atomic Spectroscopy
Laboratory, University of Debrecen
H-4032 Debrecen, Egyetem tér 1.

Fehér M.

Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi
és Környezetgazdálkodási Kar, Állattudományi, Biotechnológiai
és Természetvédelmi Intézet
Laboratory of Aquaculture, Institute of Animal Science, Biotechnology and Nature
Conservation, Department of Animal Husbandry, Faculty of Agricultural and
Food Sciences and Environmental Management, University of Debrecen
H-4032 Debrecen, Böszörményi út 138.

Bársony P.

Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és
Környezetgazdálkodási Kar, Állattudományi, Biotechnológiai
és Természetvédelmi Intézet
Fish Biology Educational Base, Institute of Animal Science, Biotechnology
and Nature Conservation, Department of Animal Nutrition, Faculty of Agricultural
and Food Sciences and Environmental Management, University of Debrecen,
H-4032 Debrecen, Böszörményi út 138.