

A tojáshéjpigmentek szerkezeti funkciójának és antioxidáns szerepüknek kísérletes vizsgálata énekesmadaraknál

A madarak tojáshéjszínezetében megtalálható változatosságot hagyományosan a ragadozók és költési paraziták által kiváltott szelekció eredményének tartják, azonban az utóbbi években más hipotézisek is felmerültek. Elképzelhető, hogy a pigmentek erősítik a vékonyabb tojáshéjat, valamint a tojó és a tojás minőségét jelezhetik a hím felé, hogy az a szaporodási befektetését az adott fészekaljba megnövelje. A tojáshéj színezetét két pigment hozza létre, a kékeszöld biliverdin, mely antioxidáns aktivitású, és a barnászöld protoporfirin, mely pro-oxidáns aktivitású. A tojáshéj pigmentek mennyisége és eloszlása fajon belül a fészekaljak között és fészekaljon belül is változhat, melynek hátterében genetikai, élettani, illetve környezeti tényezők is állhatnak. Amennyiben a tojáshéj színe és a tojáshéj vastagsága, illetve a tojássárgája összetétele között összefüggés található, ez egy nem-destruktív módja lehet a tojásmínőség becslésének különböző élőhelyek, évek vagy populációk között, melyet a természetvédelemben is lehetne hasznosítani. A tojáshéj színét az élőhelyen található táplálék és kalcium elérhetőség, illetve a szennyező anyagok becslésére, valamint a szülői minőség, illetve az utódok túlélési valószínűségének jelzésére is fel lehetne használni.

Kutatásunk során arra kerestük a választ, hogy mely tényezők (tojáshéj szerkezete, tojó kondíciója, tojás minősége, környezeti tényezők) befolyásolhatják a tojáshéj kékeszöld és barnászöld pigmentációjának fajon belüli varianciáját énekesmadaraknál, illetve lehet-e valamilyen költsége a tojáshéj pigmentációnak. Vizsgálatainkat egyrészt a Pilisben az ELTE Viselkedésetkológiai Csoportjának mesterséges odútelepein végeztük széncinegével (*Parus major*), másrészt az ELTE TTK déli épületében kialakított madárházban kanárral (*Serinus canaria*). A laboratóriumi elemzéseket az ELTE Állattrendszertani és Ökológiai Tanszék laboratóriumjában, az ELTE Kémiai Intézet Elválasztástechnikai Kutató és Oktató Laboratóriumjában, illetve külföldön (Antwerpeni Egyetem) végeztük. A kutatásba alapszakos és mesterszakos szakdolgozók, illetve doktorandusz-hallgatók is bekapcsolódtak, illetve az analitikai kémiai fejlesztésekből több szakdolgozat is született.

A kutatás eredményei

Kutatásainkból összességében 8 elfogadott folyóirat közlemény, 4 nemzetközi és 3 hazai konferencia abstract, valamint 1 alapszakos és 2 mesterszakos szakdolgozat született. Az alábbiakban összefoglaljuk főbb eredményeinket.

1. A tojáshéj pigmentáció szerkezeti erősítő funkciója

Széncinegéknek adtunk kalciumban gazdag táplálékforrást a tojásrakás időszaka alatt, és a kezelés hatását vizsgáltuk a tojáshéj pettyezettségére. Fényképet készítettünk a fészekaljról, hogy a tojáshéj pettyek sötétségét és eloszlását osztályozzuk, és négy tojást begyűjtöttünk minden fészekből. Eredményeink alapján a kalciummal etetett tojók nagyobb méretű tojásokat raktak, de a tojáshéj vastagságát nem befolyásolta szignifikánsan a kezelés. A megnövelt kalcium elérhetőség csökkentheti az időt és energiát, amelyet a madaraknak a kalciumban gazdag táplálék keresésére kell szánniuk, ezáltal több tápanyagot gyűjthetnek össze, és így nagyobb méretű tojásokat rakhatnak. Fészekaljon belül a később lerakott tojások héján nagyobb és sötétebb pettyek voltak, kevésbé egyenletes elrendezésben, mint a korábban lerakott tojásokon. A tojások lerakási sorrendjével növekedett a tojásméret, kerekesebb lett a

tojásforma és vékonyodott a tojáshéj. Ezek a jellemzők összefüggtek a tojáshéj pigmentáció jellegzetességeivel, ami magyarázhatja a pigmentációs mintázat változását a tojások lerakási sorrendjével. Továbbá azt találtuk, hogy azok a tojások, melyek a tompa végen csoportosuló, nagyméretű pettyeket (gyűrűt) viseltek vékonyabb héjúak voltak, mint azok, amelyeken nem volt gyűrű (*Hargitai et al. 2013*).

Kanárikkal 2014-ben végeztünk egy korrelatív vizsgálatot, melynek során a tojások pettyezettségi mintázatát fényképek alapján osztályoztuk, a tojáshéj színintenzitását spektrofotométerrel mértük, a tojáshéj vastagságát pedig mikrométerrel mértük. A szécinegére kapott eredményeinkhez hasonlóan a kanárinál is azt tapasztaltuk, hogy azok a tojások, melyek a tompa végen csoportosuló, nagyméretű pettyeket viseltek vékonyabb héjúak voltak, mint azok, amelyeken nem volt ilyen gyűrű. A kelés a tojás legszélesebb részén történik, ezért adaptív lehet, ha ezen a területen a héj vékonyabb, mint a tojás többi részén. A protoporfirin pigment-gyűrű erősítheti a héjat ezen a területen, amely főleg a vékony héjú tojásoknál lehet fontos. Eredményeink tehát támogatják azt a hipotézist, hogy a csoportosuló protoporfirin-alapú pettyezettségnek szerkezeti erősítő szerepe lehet a tojáshéjban (*Hargitai et al. 2016a*). A tojás kékeszöld színének intenzitása viszont nem függött össze a tojáshéj vastagságával kanárinál. Eredményeink alapján tehát a biliverdinnek valószínűleg nincs tojáshéj erősítő funkciója (*Hargitai et al. 2016a*).

2. A tojáshéj pigmentáció minőségjelző funkciója

Vizsgálatunk során arra kerestük a választ, vajon a tojáshéj kékeszöld és barna pigmentációja jelezheti-e a tojó vagy a tojás minőségét. Eredményeink szerint azok a szécinege tojók, amelyek sötétebben pettyezett tojásokat raktak, magasabb limfocitaszámot mutattak a vérkenetek elemzése során, és halványabb sárga és UV tollazati színük volt, melyek a gyengébb egészségi állapotot és egyedi minőséget jelezhetik (*Hargitai et al. 2016b*). Hasonlóan ehhez az eredményhez, kanárinál kimutattuk, hogy az intenzívebb barna pettyezettségű tojásokat rakó tojók gyengébb kondíciójúak voltak (*Hargitai et al. 2016a*).

Továbbá azt találtuk, hogy a sötétebben pettyezett tojások sárgájában alacsonyabb volt az antioxidáns (karotinoid, E-vitamin) koncentráció a szécinegénél (*Hargitai et al. 2016b*) és a kanárinál egyaránt (*Hargitai et al. 2016a*). A tojáshéj petty sötétség a territórium minőségét is jelezheti, mivel eredményeink azt mutatták, hogy a kisebb fészekaljat rakó tojók tojásainak héjában magasabb volt a protoporfirin koncentráció (*Hargitai et al. 2016b*). Ezek az eredmények arra utalhatnak, hogy a sötétebben pettyezett tojások a gyengébb egészségi állapotú és kondíciójú tojót, a gyengébb minőségű territóriumot és az alacsonyabb antioxidáns koncentrációjú tojássárgáját jelezhetik.

Kanárra kapott eredményeink alapján a tojáshéj kékeszöld színe intenzívebb volt azoknál a tojóknál, melyek antioxidánsokban és vitaminokban gazdagabb táplálékot kaptak a tojásrakás előtti és tojásrakás alatti időszakban (*Hargitai et al. 2016a*). Ezenkívül a tojásrakás alatt (*Hargitai et al. 2016a*) és a tojásrakást megelőzően (*Hargitai et al. 2017a*) jobb kondíciójú kanári tojók élénkebb kékeszöld színű tojásokat raktak. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a tojáshéj élénkebb kékeszöld színezete a tojó jobb antioxidáns elérhetőségét és jobb kondícióját jelezheti (*Hargitai et al. 2016a*), de csak abban az esetben, ha a táplálék elérhetősége nem limitált ebben az időszakban (*Hargitai et al. 2017a*). A tojáshéj kékeszöld színintenzitása a tojások lerakási sorrendjével növekedett. A tojó tojásrakás alatti és azt követő plazma oxidatív státuszával nem függött össze a tojáshéj kékeszöld színintenzitása, tehát a tojáshéj pigmentációnak ilyen jellegű költségét nem tudtuk kimutatni. Az intenzívebb kékeszöld színű tojásokban kissé magasabb volt a sárgája E-vitamin szintje, bár az összefüggés csak marginálisan volt szignifikáns (*Hargitai et al. 2016a*). Eredményeink arra utalnak tehát, hogy mind a barna, mind a kékeszöld tojáshéjszín indikátora lehet a tojó

kondíciójának és a tojás minőségének, illetve ezeken keresztül a környezet (elsősorban a táplálékélérhetőség) minőségének.

3. A tojáshéj pigmentáció összefüggése a környezeti tényezőkkel (táplálékélérhetőség, hőmérséklet, költési egyedsűrűség, fémszennyezés)

Szécinegére kapott eredményeink alapján a költési időszak elején, amikor az antioxidánsokban gazdag hernyók elérhetősége még korlátozott, a tojók sötétebben és sűrűbben pettyezett héjú tojásokat raktak. Ezenkívül hidegebb időben és nagyobb költési sűrűségű területeken is fokozottabban pettyezett tojásokat raktak a szécinegék. Azonban a pettyek eloszlása, amely a tojáshéj protoporfirin koncentrációjától független volt, nem mutatott szignifikáns kapcsolatot ezekkel a környezeti tényezőkkel. Ez alapján a szécinege tojáshéjának fokozottabb pettyezettsége az alacsonyabb antioxidáns elérhetőségre és a kedvezőtlenebb környezeti viszonyokra utalhat, a pettyek eloszlását viszont ezek a tényezők nem befolyásolják (*Hargitai et al. 2016c*).

Eredményeink alapján a talaj és a tojáshéj nagyobb koncentrációban tartalmazott fémeket a városi élőhelyen (Budai Arborétum), mint az erdei (Pilis) élőhelyen. Azonban a tojáshéj pettyek színének intenzitása és a pettyek eloszlási mintázata nem tért el a városi és az erdei élőhely között. A tojáshéj petty intenzitás nem mutatott összefüggést a tojáshéj fém (ólom, réz, cink) koncentrációjával sem. A csoportosuló pettyezettségi mintázat a tojáshéj magasabb réz koncentrációjával függött össze. Elképzelhető, hogy a réz gyengíti a tojáshéj szerkezetét és a csoportosultabb pettyezettség ezt kompenzálhatja azáltal, hogy a protoporfirin pigment erősíti a héjat. Megállapíthatjuk, hogy a tojáshéj pettyezettség sötétsége a szécinegénél nem alkalmas arra, hogy érzékenyen jelezze a fém szennyezést (*Hargitai et al. 2016d*).

Kísérletes vizsgálatunk során a kanárik egy csoportja csökkentett mennyiségű táplálékot kapott a tojásrakás előtt és alatt, abból a célból, hogy megállapítsuk, vajon a tojáshéj barna és kékeszöld színezetét befolyásolja-e a tojó kondíciója, illetve a tojásrakás alatti táplálékélérhetőség. Eredményeink szerint a kezelés nem befolyásolta szignifikánsan a tojáshéj kékeszöld színezetét és biliverdin koncentrációját. A tojó kondíciója és a tojáshéj kékeszöld színintenzitása között pozitív összefüggést kaptunk a kontroll csoportban, azonban a limitált táplálékot kapó csoportban nem volt szignifikáns a kapcsolat (*Hargitai et al. 2017a*). A táplálékhiány következtében csökkenhet a tojó antioxidáns kapacitása, és így valószínűleg nem képesek olyan kékeszöld tojáshéjszín létrehozni, amely megbízhatóan jelezne a kondícióját. Továbbá azt találtuk, hogy a limitált táplálékot kapó tojóknál a tojáshéj pettyek sötétebbek voltak és a tojáshéj protoporfirin koncentrációja magasabb volt. A táplálékhiány megváltoztathatja a vérben található hormonok, antioxidánsok, fehérjék és zsírsavak mennyiségét, illetve bizonyos enzimek génexpresszióját és aktivitását, és ezek a változások kihathatnak a protoporfirin termelésére és tojáshéjba juttatására. A tojáshéj pettyezettség eloszlását azonban sem a kezelés, sem a tojó kondíciója nem befolyásolta (*Hargitai et al. 2017a*). Eredményeink alapján tehát a táplálékhiány fokozhatja a tojáshéj protoporfirin-alapú barna színezetét, valamint befolyásolhatja a tojó kondíciójának és a tojáshéj kékeszöld színintenzitásának összefüggését.

4. A tojáshéj pigmentek képződési helyének vizsgálata

A biliverdin és protoporfirin pigmentek akkor jutnak a tojáshéjba, amikor a fejlődő tojás a héjmirigyben tartózkodik. Azonban nem egyértelmű, hogy a tojáshéj pigmentek hol képződnek. Elképzelhető, hogy a tojáshéj pigmentek a héjmirigyben szintetizálódnak, vagy az előregedett vörösvérsejtekből származnak, vagy pedig más szervekben képződnek és a keringéssel jutnak a héjmirigybe. Kanárira kapott eredményeink alapján nem volt szignifikáns

kapcsolat a kísérletesen növelt vérszegénység, a hematokrit érték és a tojáshéj kékeszöld és barna pigmentációjának intenzitása között, így kevésbé valószínű, hogy a tojáshéj pigmentek a vörösvérsejtekből származnak (*Hargitai et al. 2017b*). Ezenkívül nem találtunk szignifikáns korrelációt a tojó ürülék biliverdin szintje és a tojáshéj kékeszöld színintenzitása között sem, így valószínű, hogy a tojáshéj biliverdin pigmentje nem a lépben vagy májban termelődött biliverdinből származik, hanem a héjmirigyben szintetizálódik. Ezek alapján a tojáshéj kékeszöld színezete várhatóan nem csökkenti a keringésben lévő biliverdinnek, mint lehetséges antioxidáns molekulának, az elérhetőségét (*Hargitai et al. 2017b*).

A protoporfirin pigmentnél negatív korrelációt tapasztaltunk a vérplazma és az ürülék protoporfirin koncentrációja és a tojáshéj barna pigmentációjának intenzitása között. Ez az eredmény arra utalhat, hogy a máj intenzívebb protoporfirin termelése, amely megnövelte a vérplazma és az ürülék protoporfirin szintjét, gátolhatta a héjmirigy protoporfirin termelését, valószínűleg az enzimreakciók befolyásolása révén. Eredményeink alapján feltételezzük, hogy a tojáshéj protoporfirin pigmentje a kanárinál a héjmirigyben képződik, de a vérplazma protoporfirin szintje befolyásolhatja a pigment termelést, így összekapcsolva a tojó élettani állapotát a tojáshéj pigmentációjával (*Hargitai et al. 2017b*).

5. A keringésben lévő pigmentek összefüggése a vérplazma oxidatív állapotával

Eredményeink szerint a vérplazma protoporfirin szintje pozitívan korrelált a vérplazma antioxidáns kapacitásával, de az oxidatív károsodás szintjével nem függött össze. A pozitív összefüggést feltehetően az okozta, hogy a magasabb protoporfirin szint stimulálhatja a szervezet antioxidáns védelmi rendszerét és így megnövelheti a vér antioxidáns kapacitását. A vérplazma biliverdin koncentrációját nem tudtuk meghatározni, mivel az a kimutathatósági határ alatt volt, így nem tudtuk megvizsgálni összefüggését a vérplazma antioxidáns kapacitásával és az oxidatív károsodás szintjével (*Hargitai et al. 2017b*).

6. Analitikai kémiai módszertani fejlesztések, valamint a tojássárgája és vérplazma minták optimális tárolási körülményeinek meghatározása

Vizsgálataink során vérplazma, ürülék, tojáshéj, illetve tojássárgája minták elemzését végeztük el. A mérésekhez újfajta módszerek kifejlesztésére volt szükség, valamint fontos volt megvizsgálni, hogy a mintákat milyen hőmérsékleten, mennyi ideig lehet jelentős veszteség nélkül tárolni. A vérplazma, az ürülék, és a tojáshéj pigment szintjének analitikai kémiai meghatározásához módszertani fejlesztések történtek, melyekből egy alapszakos és két mesterszakos szakdolgozat született (*Nyiri 2013, Hámosi 2014, Neuberger 2014*). Ezenkívül a a vérminták tárolási lehetőségeit a vérplazma oxidatív károsodásának és teljes antioxidáns kapacitásának meghatározásával kapcsolatban is megvizsgáltuk (*Hargitai et al. 2016e*).

Közlemények listája

Folyóirat publikációk

- 1) Hargitai R, Nagy G, Herényi M, Török J 2013. Effects of experimental calcium availability, egg parameters, and laying order on Great Tit *Parus major* eggshell pigmentation patterns. *Ibis* 155:561-570.
Impakt faktor: 1,861
- 2) Hargitai R, Boross N, Nyiri Z, Eke Zs 2016a. Biliverdin- and protoporphyrin-based eggshell pigmentation in relation to antioxidant supplementation, female characteristics and egg traits in the canary (*Serinus canaria*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 70:2093-2110.
Impakt faktor: 2,185
- 3) Hargitai R, Herényi M, Nagy G, Nyiri Z, Eke Zs, Török J 2016c. Effects of environmental conditions on the egg mass, yolk antioxidant level, eggshell thickness and eggshell spotting pattern of Great Tits (*Parus major*). *Journal of Ornithology* 157:995-1006.
Impakt faktor: 1,468
- 4) Hargitai R, Nagy G, Herényi M, Nyiri Z, Laczi M, Hegyi G, Eke Zs, Török J 2016b. Darker eggshell spotting indicates lower yolk antioxidant level and poorer female quality in the Great Tit (*Parus major*). *Auk* 133:131-146.
Impakt faktor: 2,096
- 5) Hargitai R, Nagy G, Nyiri Z, Bervoets L, Eke Zs, Eens M, Török J 2016d. Effects of breeding habitat (woodland versus urban) and metal pollution on the egg characteristics of great tits (*Parus major*). *Science of the Total Environment* 544:31-38.
Impakt faktor: 4,900
- 6) Hargitai R, Nyiri Z, Eke Zs, Török J 2016e. Effects of temperature and duration of storage on the stability of antioxidant compounds in egg yolk and plasma. *Physiological and Biochemical Zoology* 89:161-167.
Impakt faktor: 2,104
- 7) Hargitai R, Boross N, Hámori S, Neuberger E, Nyiri Z 2017b. Eggshell biliverdin and protoporphyrin pigments in a songbird: are they derived from erythrocytes, from blood plasma or from the shell gland? *Physiological and Biochemical Zoology* (DOI: 10.1086/694297)
Impakt faktor: 2,104 (2016)
- 8) Hargitai R, Boross N, Nyiri Z, Eke Zs 2017a. Effects of food limitation on the intensity of blue-green and brown eggshell coloration: an experimental study with the canary. *Journal of Avian Biology* (DOI: 10.1111/jav.01486)
Impakt faktor: 2,228 (2016)

Szakdolgozatok

- 1) Hámori Susanne 2014. Biliverdin és protoporfirin meghatározása madarak vérplazmájából LC-MS/MS technikával. BSc szakdolgozat, ELTE
- 2) Neuberger Eszter 2014. Protoporfirin és biliverdin meghatározása folyadékkromatográfiás módszerrel madárürülékből. MSc szakdolgozat, ELTE
- 3) Nyiri Zoltán 2013. Porfirinvázis színanyagok meghatározása folyadékkromatográfiás módszerrel tojáshéjból. MSc szakdolgozat, ELTE