Szent István Egyetem

A MÉLYHŰTÉS OKOZTA KÁROSODÁSOK VIZSGÁLATA 3 HALFAJ SPERMIUMAIN

Doktori értekezés

Miskolczi Edit

GÖDÖLLŐ

2007

A Doktori Iskola:

Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

Tudományág:

Mezőgazdaságtudomány

Alprogram:

Halbiológia és halgazdálkodás

Doktori program vezetője:

Dr. Horváth László
Egyetemi tanár, MTA doktora
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar,
Halgazdálkodási Tanszék

Témavezető:

Dr. Urbányi Béla
Egyetemi docens, tanszékvezető
Szent István Egyetem, Mezőgazdaság-és Környezettudományi Kar,
Halgazdálkodási Tanszék

A programvezető aláírása A témavezető aláírása

Tartalomjegyzék

1. BEVEZETÉS 5

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS 8

2.1. A SPERMAMÉLYHŰTÉS 8

2.1.1. A spermamélyhűtés módszerei 8

2.1.2. A spermamélyhűtés folyamata 9

2.1.2.1. A natív sperma minősítése 9

2.1.2.2. A sperma hígítása a hűtőmédiummal 10

2.1.2.3. Az equilibráció 10

2.1.2.4. A hűtés és tárolás 10

2.1.2.5. A felolvasztás és minősítés 11

2.1.2.6. Termékenyítés 11

2.1.3. Az élő sejtet érő hatások a krioprezerváció során 12

2.1.3.1. Hipertóniás hatás 12

2.1.3.2. A térfogatváltozás hatása 12

2.1.3.3. Hidegsokk, hideg-érzékenység 13

2.1.3.4. A pH hatás 13

2.1.3.5. Az intracelluláris jég mechanikai hatása 13

2.1.3.6. Az extracelluláris jég mechanikai hatása 14

2.1.3.7. Fagyásvédő (krioprotektáns) anyagok hatásai 14

2.1.3.8. A háttérsugárzás hatása 15

2.1.4. A spermát érő lehetséges károsodások és annak okai 16

2.2. KROMOSZÓMAPREPARÁLÁS 17

2.2.1. Kariotípus 17

2.2.1.1. Kariotípus és az evolúció 18

2.2.2. A legfontosabb hazai halfajunk, a ponty (*Cyprinus carpio, L.)* kariológiai jellemzése 20

2.2.3. Kromoszómavizsgálati módszerek 20

2.2.3.1. Direkt módszer 22

2.2.3.2. Indirekt (szövettenyésztéses) módszer 23

2.3. A COMET MÓDSZER 24

3. ANYAG ÉS MÓDSZER 32

3.1. KÍSÉRLETEK AFRIKAI HARCSA FAJON 32

3.1.1. A kísérleti halak beszerzése és tartása 32

3.1.2. Az ivartermékek elvétele 33

3.1.2.1. Az oltás 33

3.1.2.2. A sperma kinyerése és minősítése 33

3.1.3. A spermamélyhűtés folyamata 34

3.1.3.1. A sperma hígítása hűtőmédiummal 34

3.1.3.2. A sperma hűtése 34

3.1.3.3. Felolvasztás 35

3.1.3.4. Az ikrások fejése 35

3.1.3.5. Termékenyítés és keltetés mélyhűtött, illetve natív spermával 36

3.1.4. Kromoszómavizsgálat 36

3.1.4.1. A vizsgálat előkészítése 36

3.1.4.2. Kromoszóma-preparálás direkt módszerrel 37

3.1.4.3. Kromoszómaszámlálás 38

3.2. KÍSÉRLETEK PONTY FAJON 38

3.2.1. Nagyméretű műszalmák használatának tesztelése 38
3.2.1.1. A kísérleti állatok tartása 38
3.2.1.2. Az egyedek oltása 39
3.2.1.3. A tejesek fejése 39
3.2.1.4. A sperma mélyhűtése 40
3.2.1.5. Az ikrások fejése 40
3.2.1.6. A mélyhűtött spermával történő termékenyítés 41
3.2.1.7. Kromoszómavizsgálat 41
3.2.1.8. Az adatok statisztikai feldolgozása 41
3.2.2. Különböző hűtőmédiumok vizsgálata ponty spermamélyhűtésének optimlizálására 42
3.2.2.1. A hűtés menete, előkészítése 42
3.2.2.2. A mélyhűtött spermával történő termékenyítés 43
3.2.2.3. Az eredmények statisztikai feldolgozása 43
3.3. KÍSÉRLETEK RÓZSÁS DÍSZMÁRNA FAJON 44
3.3.1. Rózsás díszmárna spermamélyhűtése 44
3.3.1.1. A tejesek fejése 44
3.3.1.2. A sperma mélyhűtése 45
3.3.1.3. Az ikrások fejése 46
3.3.1.4. A mélyhűtött spermával történő termékenyítés 46
3.3.1.5. Az eredmények statisztikai feldolgozása 47
3.3.2. Comet módszer 47
3.3.2.1. Tárgylemezek preparálása 47
3.3.2.2. Oldatok összeállítása 48

4. EREDMÉNYEK ***50***
4.1. AFRIKAI HARCSA FAJON VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI 50
4.2. PONTY FAJON VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI 54
4.2.1. Nagyméretű műszalmák használatának eredményei 54
4.2.2. Különböző hígítók alkalmazásának eredményei 58
4.3. RÓZSÁS DÍSZMÁRNA FAJON VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI 61

5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK ***65***
5.1. AFRIKAI HARCSA FAJON KAPOTT EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE 65
5.2. PONTY FAJON KAPOTT EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE 68
5.2.1. Nagyméretű műszalmák használatánál kapott eredmények értékelése 68
5.2.2. Különböző hígító alkalmazásakor kapott eredmények értékelése 69
5.3. RÓZSÁS DÍSZMÁRNA FAJON KAPOTT EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE 71

6. JAVASLATOK ***74***

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ***75***

8. ÖSSZEFOGLALÁS ***76***

9. SUMMARY ***79***

10. IRODALOMJEGYZÉK ***82***

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK ***94***
11.1 TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK 94
11.2. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK 94

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS ***97***

1. BEVEZETÉS

A spermamélyhűtés Polge és munkatársai (1949) felfedezése óta robbanásszerű fejlődésnek indult. A gazdasági állatok nagy részénél az ipari méretű tartással járó mesterséges szaporítás elképzelhetetlen volna mélyhűtött ivartermék használata nélkül. A szarvasmarhánál, mint a legfontosabb gazdasági haszonállat fajnál a genetikai előrehaladás nagymértékben köszönhető annak, hogy csak a legjobb tulajdonságokra szelektált apaállatoktól származó mélyhűtőtt ivartermékkelkal végzik a szaporítást. A mélyhűtött sperma használatával megszűnnek az országhatárok, a földrajzi és fizikai gátak, mindenki számára elérhetővé válik a legjobb genetikai állományú örökítőanyag. A technika alkalmazásával több ezer utód születhet, akár az apa halála után is, fenntartva így a nagyértékű, több évtizedes szelekción alapuló tulajdonságokat.

A csontoshalak, mint a gerincesek törzsének legfejletlenebb osztálya, magukon hordozzák a fejlettebb osztályok tulajdonságainak jórészét. Így a halak hasznos modelljei lehetnek a fejlettebb gerinces osztályoknak. Szaporodásbiológiai modellállatként a nagymennyiségű ivartermék és az ivaréréshez szükséges rövid időtartam teszi alkalmassá a halakat termékenyülési, szaporítási kísérletek elvégzéséhez.

Azoknál a haszonállat fajoknál, ahol a mesterséges termékenyítés mélyhűtött sperma használatával széles körben elterjedt, felbecsülhetetlen gazdasági értékkel bír a mélyhűtés. Mivel a halfajok jórészénél már a kutatók rendelkezésére áll a megfelelő mélyhűtési protokoll, rövid időn belül várható, hogy egyre szélesebb körben igény lesz ennek a gyakorlati halszaporításban alkalmazható adaptációjára, melyhez az utóbbi évtizedekben felhalmozódó ismeretanyag biztosítja a tudományos megalapozottságot.

Hasonlóan más gazdasági haszonállatokhoz, a halaknál is nagy gazdasági előnnyel járna legalább az egyik ivarsejt hosszú távú tárolása mélyhűtéssel, ipari méretekben, a genetikai anyag károsodásának kiküszöbölésével. Ez megoldást jelenthet nemcsak a nagy értékű tenyészállományok megőrzésére, genetikai anyaguk fenntartásához (Tiersh és mtsai, 2004), hanem ezzel a módszerrel egy

esetleges természeti katasztrófa vagy havária után is reprodukálni lehet a kívánt tulajdonságot.

Korábbi tárolási kísérletekben merült fel az a probléma, hogy a mélyhűtött spermával termékenyített utódok között nagyobb arányú torz lárva kelését tapasztalták a kutatók, mint a natív spermával termékenyített csoportban, azonos termékenyítési és keltetési körülmények között. Ennek a problémának a megoldása kulcsfontosságú lépés a mélyhűtött sperma keltetőházi és tenésztési gyakorlatban való alkalmazásához.

A fentiek alapján munkám során három halfajon (afrikai harcsa /*Clarias gariepinus*/, ponty /*Cyprinus carpio/,* rózsás díszmárna /*Barbus conchonius*/) vizsgálva kívánom összevetni a károsodás mértékét és formáit. A rózsás díszmárna elterjedt laboratóriumi modellfaj, rövid a generációs intervalluma, könnyen szaporítható, kezelhető, az eredmények gyorsan kiértékelhetőek. Az afrikai harcsa egyre növekvő gazdasági szereppel rendelkező trópusi eredetű haszonhal, amely könnyű szaporíthatósága, méretéhez képest kis helyigénye, kiváló technológiai tűrőképessége és ikrájának rövid inkubációs ideje miatt ideális laborállat is egyben. A ponty a legjelentősebb gazdasági halfajunk, a tenyésztési és nemesítési technológiák (köztük az ivarsejtek mélyhűtése) adaptálása a haltenyésztésben ennél a halfajnál várható a legkorábban.

Mindhárom megnevezett halfajnál kísérletekkel tisztázni kell, hogy mi okozza a mélyhűtött spermával történő termékenyítések során tapasztalt torz embriók kelését.

Munkám céljai az alábbiak voltak:

1. Vizsgálni kívánom, hogy a különböző védőanyagok (krioprotektánsok) milyen hatással vannak a mélyhűtött hímivarsejtek termékenyítőképességére, továbbá a mélyhűtőtt sperma alkalmazásakor kikelt lárvákfejlődésére és a torzképződésre.

2. A mélyhűtési technológia üzemi méretű továbbfejlesztéseként tesztelem a nagyméretű műszalmák használatának lehetőségeit ponty és afrikai harcsa esetében, annak érdekében, hogy a keltetőházi gyakorlatban is rutinszerűen használhatóvá váljék a módszer.
3. Kísérletet teszek a rózsás díszmárna spermájának mélyhűtésére, mellyel eddig egyetlen kutató sem foglalkozott. Adaptálni kívánom a ponty fajon alkalmazott mélyhűtési módszereket, szükség esetén módosítani azokat.
4. A mélyhűtőtt sperma kelő lárvákra ható negatív hatásait direkt kromoszómavizsgálattal kívánom ellenőrizni, melyek során a kikelt egyedek kromoszómaszámát meghatározva keresek összefüggést a torzképződés és a hűtési technológia (alkalmazott védőanyag, hígító, illetve műszalma méret) között.
5. Gél elektroforézis alkalmazásával (Comet assay) választ szeretnék kapni, hogy a spermiumok DNS tartalma mennyire károsodott a mélyhűtés során, és ezáltal közvetett bizonyítékot nyerhetek a torzképződések magyarázatára.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A SPERMAMÉLYHŰTÉS

A sikeres ivarsejt mélyhűtés első lépését a glicerin védőhatásának felfedezése jelentette. Baromfisperma mélyhűtése során a közegbe véletlenül glicerin került és a felolvasztás után Polge és mtsai. (1949) mozgó spermiumsejteket talált. Ez a felfedezés vált a mélyhűtés kiinduló pontjává és indította el a kísérletezést egyéb sejtek, szövetek esetében is.

A felfedezés hatására a szarvasmarhánál, mint a legjelentősebb gazdasági állatnál vált a kutatómunka a legintenzívebbé. Smith és Polge a cambridge-i egyetemen 1950-ben sikeresen hűtött bikaondót, majd egy év múlva, 1951-ben Stewart már felolvasztott bikaondóval történő mesterséges termékenyítéssel született borjakról számolt be közleményében. Napjainkra a szarvasmarha szaporításban elengedhetetlenné vált a mélyhűtött sperma használata az üzemi tenyésztésben és hozzájárul a nemesítés hatékonyságának növeléséhez, ezzel a genetikai előrehaladás felgyorsulásához.

A hal spermamélyhűtés alapjait Blaxter (1953) tette le, akinek sikerült életképes heringspermát nyernie szárazjégen történő hűtés után. Az azóta eltelt több, mint fél évszázadban több száz halfaj spermáját sikerült mélyhűteni. A spermamélyhűtés a pisztrángféléknél áll a legközelebb az üzemi alkalmazáshoz, míg a porcos halakhoz tartozó tokfélék spermamélyhűtéséről is egyre több kutató számolt be (Cherepanov és mtsai., 1993; Magyary, 1993; Glogowski és mtsai., 2002; Urbányi és mtsai., 2003; Ciereszko és mtsai, 2006) az elmúlt években.

2.1.1. A spermamélyhűtés módszerei

Az egyik legrégebben alkalmazott technológia a szárazjégen történő mélyhűtés, amely rendkívül alkalmas közeg a technika kivitelezésében. Azonban

hátránya, hogy a szárazjég hőmérséklete állandó, így a hűtési sebesség nem változtatható és a felolvasztás is nehézkes.

Az utóbbi évtizedekben teret hódított a folyékony nitrogénben történő mélyhűtés. Ez a technológia igen egyszerűen kivitelezhető, gyors és költséghatékony, akár a keltetőházban is elvégezhető. Az eljárás során a megfelelően hígított spermát műszalmákba szívják fel, majd szigetelő dobozba töltött nitrogén gőzében történik meg a hűtés. A hűtés sebessége a nitrogén felszínére helyezett hungarocell keretek (Bayness és Scott, 1987; Glogowsi és mtsai, 2002) vagy állítható magasságú fémrácsok segítségével történik (Rana és McAndrew, 1989).

Folyékony nitrogén gőzében történik a mélyhűtés a programozható hűtőgépeknél is (Linhart és mtsai, 2005). Használatuk során a hűtés egész folyamata számítógép által vezérelt, így pontos munkát tesz lehetővé. Hátránya, hogy a mélyhűtés csak laboratóriumban kivitelezhető ezzel a módszerrel, mivel mérete és eszközigénye miatt helyhez kötött (Urbányi és mtsai., 1998).

2.1.2. A spermamélyhűtés folyamata

2.1.2.1. A natív sperma minősítése

A lefejt spermát a következő szempontok alapján szokták minősíteni:

1. az előrehaladó mozgást végző spermiumok százalékos aránya (motilitás)
2. a haladó mozgás ideje (sec)
3. a haladó mozgás intenzitása
4. a sperma mennyisége (ml)
5. a sperma koncentrációja (spermiumszám/ml sperma)
6. spermiumok morfológiája

A gyakorlatban a mélyhűtés előtt közvetlenül általában becsléssel az első szempont szerint minősítik a spermát. Mélyhűtésre csak a jó motilitású (minimum

80%), nem aktiválódott, szennyeződéstől mentes spermát érdemes felhasználni. A mozgási időt és a sperma mennyiségét hagyományos mérési módszerekkel állapítják meg, míg a koncentrációt Bürker-kamrában történő sejtszámlálással.

2.1.2.2. A sperma hígítása a hűtőmédiummal

A hűtőmédium hígítóból (reverzibilisen immobilizáló oldat) és védőanyagból álló keverék, melyet a spermához adnak, mielőtt az equlibráció és a hűtés megtörténne. A jó hígító a következő kritériumoknak felel meg: a halsperma mozgását nem aktiválja, nem tartalmaz toxikus összetevőt, pH-ja enyhén lúgos és jó pufferkapacitású (Leung, 1991). Védőanyagok közül a gyorsan behatoló intracelluláris védőanyagok alkalmazhatók a halsperma hűtése során, általában 5-15 százalékos koncentrációban. A sperma:hűtőmédium arányt általában 1:1-1:10 között alkalmazzák.

2.1.2.3. Az equilibráció

Az equilibráció a védőanyag koncentráció kiegyenlítődése az extra- és intracelluláris tér között. Optimális ideje függ a spermium membránpermeabilitásától, az adott anyag behatolóképességétől és a hőmérséklettől is, így kísérleti úton kell meghatározni a megfelelő időt. Ha a spermium kisméretű és jó membránpermeabilitású (pl. a zebradániónál), akkor a DMSO és a metanol alkalmazásakor az equilibráció igen rövid idő alatt (1-2 perc) lezajlik (Harvey és mtsai., 1983).

2.1.2.4. A hűtés és tárolás

A hűtés történhet műszalmában, műanyag- illetve üvegcsőben valamint alumínium tasakokban. Meg kell találni az optimális térfogatot, ahol a sperma

minőségének megőrzése mellett nagymennyiségű ikrát tudunk egy mélyhűtött spermaadaggal termékenyíteni (Magyary és mtsai., 1996). A szarvasmarháknál bevált, műszalmákban történő hűtés a legelterjedtebb a halak esetében is. A megfelelő műszalma méretet kísérleti úton lehet megállapítani. Napjainkban egyre nagyobb méretű műszalmák tesztelése folyik, nem ritka a 2,5-4 ml-es szalmák használata sem (Velasco-Santamaria és mtsai, 2006) és találkozhatunk 5 ml-es szalma használatával is (Lahnsteiner és mtsai, 1997). Az egyedileg jelölt minták tárolása folyékony nitrogént tartalmazó kaniszteres kannában történik.

2.1.2.5. A felolvasztás és minősítés

A műszalmák felolvasztása 0-40 °C-os vízfürdőben történik. Idejét a műszalma mérete határozza meg. Az alacsony hőmérséklet előnye lehet a védőanyagok felolvasztás utáni toxicitásának csökkentése, hátránya viszont a lassú felolvadás és az újrakristályosodás által okozott intracelluláris károsodás. Felolvasztás után újból meg kell határozni a motilitást, így ellenőrizhetjük a hűtési és a felolvasztási eljárás túlélésre gyakorolt hatását. Termékenyítéskor a felolvasztott sperma motilitását kell figyelembe venni a sperma/ikra arány kialakításához.

2.1.2.6. Termékenyítés

A felolvasztás után a spermiumok a natívtól eltérő mozgást mutatnak (Billard, 1978) és a sperma termékenyítőképessége általában gyorsan csökken, a termékenyítést mielőbb el kell végezni. A termékenyítéshez általában az ívási időszak vízhőmérsékletének alsó határa az optimális, mivel alacsonyabb hőmérsékleten a spermiumok energiakészletüket lassabban használják fel. A hűtési eljárás okozta mortalitás és minőségromlás miatt hasonló termékenyülés eléréséhez mélyhűtött spermából több szükséges (Kurokura és Hirano, 1980). Pisztrángnál például ez a natív sperma 15-szörösét jelenti.

2.1.3. Az élő sejtet érő hatások a krioprezerváció során

2.1.3.1. Hipertóniás hatás

A vizes oldatban lévő sejtek túlhűtésekor a sejtek és az oldat is túlhűlnek, amit az extracelluláris térben heterogén magképződés követ. Ennek eredményeképpen az extracelluláris térben a víz fokozatosan megfagy, az oldat koncentrációja nő (Leung, 1991). Ha a hűtés megfelelő sebességű, akkor a sejt az ozmotikus egyensúly megőrzéséhez elegendő mennyiségű vizet tud leadni. Ezt a vízmennyiséget a felolvasztás során kell visszanyernie a sejtnek. Túl gyors felolvasztás esetén azonban nem tud a sejt megfelelő sebességgel vizet felvenni. Ezt a koncentrációváltozást a legtöbb sejt elviseli. Ha a hűtés lassú, a sejtek túl sokáig vannak kitéve az extracellulárisan növekvő koncentrációnak, ami túlzott dehidratációhoz és a magas sókoncentráció miatt membrán lipoproteinjeinek a denaturációjához vezet, így letális hatású. Túl gyors hűtés esetén az ozmotikus egyensúly úgy jön létre, hogy intracelluláris jég képződik, ami szintén többnyire letális. Létezik egy optimális hűtési sebességtartomány, amely elég gyors ahhoz, hogy minimalizálja a dehidratációt és a denaturációt, ugyanakkor elég lassú az intracelluláris jégképződés letális szint alatt tartásához. Ez a tartomány kiszélesíthető fagyásgátló anyagok alkalmazásával (Dinnyés, 1993).

2.1.3.2. A térfogatváltozás hatása

A térfogatváltozás hatása szorosan összefügg a hipertóniás hatással, amely révén sejttérfogat változás jön létre. Ennek során a sejtmembrán összenyomódik és kifeszül, a pórusok és így a membrán permeabilitása megnő, ami lehetővé teszi makromolekulák leadását is (Leung, 1991). Az egyes sejttípusok eltérő mértékű térfogatváltozást képesek elviselni.

2.1.3.3. Hidegsokk, hideg-érzékenység

Hidegsokk alatt a membrán folyékony lipidtartalmának megszilárdulását értjük, amely akkor következik be, ha a hűtési sebesség különösen a kezdeti szakaszban (0 °C felett) túl gyors. A hűtés előrehaladtával a koncentráció növekedése miatt is megtörténik a lipidfázis átalakulása gélszerűvé. A hidegsokkra egyes emlősfajok (pl. sertés) embriói és spermiumai érzékenyek (Dinnyés, 1993).

2.1.3.4. A pH hatás

A fagyás és a felolvasztás lecsökkenti az intracelluláris és az extracelluláris oldatokban lévő sók pufferkapacitását, így az oldat pH-ja jelentősen változik. A hőmérséklet változásán kívül az is módosíthatja a pH-t, ha K-foszfát van jelen az oldatban a fagyásgátlók hozzáadásakor (Van Den Berg és Soliman, 1969. cit. Leung, 1991). Amennyiben a kémhatás átlépi a fehérjék számára optimális tartomány határértékét, a funkció elvesztése, illetve denaturáció lép fel.

2.1.3.5. Az intracelluláris jég mechanikai hatása

Az intracellulárisan képződő jégkristályok a sejtmembrán és a sejtorganellumok sérülését okozhatják. A károsító hatás mértéke arányos a jégkristályok méretével. Intracelluláris jég által okozott jelentős károsodás a túl gyors fagyasztás vagy a túl lassú felolvasztás során léphet fel. Ez utóbbi esetben a rekrisztallizáció révén jönnek létre a károsodást okozó, túl nagy jégkristályok (Dinnyés, 1993).

2.1.3.6. Az extracelluláris jég mechanikai hatása

Amennyiben a hűtési sebesség túl lassú, az extracellulárisan képződő jég kiterjedve túllépi azt a teret, amelyet a sejt zsugorodása biztosít és így károsodhat a sejt struktúrája. (Leung, 1991).

2.1.3.7. Fagyásvédő (krioprotektáns) anyagok hatásai

A krioprotektánsoknak szerepe a fagyás és felolvasztás okozta káros hatások mérséklése. Általában a következő két csoportjukat különböztetjük meg: a sejtmembránon áthatoló (intracelluláris) és át nem hatoló (extracelluláris) védőanyagok. Intracelluláris krioprotektáns pl. a glicerin, a metanol, a dimetil-szulfoxid (DMSO), a dimetil-acedamid (DMA), az etilén-glikol, a propilén-glikol, extracelluláris védőanyagok pedig pl. a cukrok, fehérjék, polimerek (Leibo, 1980).

A halsperma mélyhűtéséhez főként az intracelluláris térbe behatoló védőanyagok használhatók. Ezek szerepe a következő: csökkentik a víz intracelluláris térből az extracelluláris térbe történő diffúziójának sebességét, csökkentik a homogén magképződés hőmérsékletét, emelik a vitrifikációs hőmérsékletet (T_g). Ezen kívül stabilizálják a sejtmembránt és egyes lehűtésre érzékeny enzimeket megvédenek a károsodástól (Schneider és Mazur, 1984 cit. Dinnyés, 1993). Az intracelluláris fagyásvédők különböző mértékű toxicitást mutatnak. A toxicitás ezenfelül függ a hőmérséklettől, a hatásidőtől, a koncentrációtól és a sejt típusától. Radioaktív izotópokkal kimutatták, hogy a védőanyagok behatolási sebessége halikra esetében fordítottan arányos a molekulatömeggel ($A_{glicerin}$=92,1g/mol; A_{DMSO}=78,13g/mol; $A_{metanol}$ =32,04g/mol) (Harvey és Ashwood-Smith, 1982).

A fent említett krioprotektánsok közül a glicerin a legkevésbé toxikus, ugyanakkor lassan hatol be a sejtbe, így hosszabb equilibrációt igényel. Mivel a glicerin és a víz diffúziós sebessége igen különböző, a sejtet káros térfogatváltozások érik a glicerin felvételekor, illetve kivonásakor.

A metanol igen gyors behatolású, viszont az egyik leginkább mérgező védőanyag. Ennek ellenére bizonyos sejttípusoknál, többek között halspermiumoknál (Harvey és mtsai., 1983) igen jó eredményeket értek el alkalmazásával.

A DMSO kevésbé toxikus, mint a metanol és ez a toxicitás a hőmérséklet csökkenésével jelentősen mérséklődik. Ugyanakkor ellentétben a glicerinnel, a DMSO diffúziójának sebessége nem csökken a hőmérséklet süllyedésével. A DMSO gátolja a kataláz és a peroxidáz enzim aktivitását (Leung, 1991), és fehérje destabilizáló hatása van (Arakawa és mtsai., 1990). Leung (1991) szerint a DMSO koncentrációját 5 %-ról 20%-ra növelve a spermiumok motilitása a felére csökkent.

Az etilén-glikol a foszfolipid membrán dehidratációját okozza azáltal, hogy csökkenti a vizes fázis polaritását és megváltoztatja a hidrofób molekulák eloszlását a sejtmembrán és az extracelluláris tér között (Leung, 1991).

A propilén-glikol vitrifikációt elősegítő képessége viszonylag nagy, ez is indokolhatja gyakori felhasználását (McFarlane, 1985 cit. Dinnyés, 1993).

2.1.3.8. A háttérsugárzás hatása

A tárolási hőmérsékleten (-130 °C alatt) nem játszódnak le biokémiai reakciók, így a DNS-t reparáló enzimek sem működnek. Ennek nyomán a háttérsugárzás mutagén hatásai felhalmozódhatnak (Ashwood-Smith, 1986). Ez azonban átlagos háttérsugárzás esetén igen lassú folyamat. Glenister és Lyon (1986) megfigyelései alapján még 2000 évnek megfelelő elnyelt dózis sem okozott észlelhető elváltozásokat egérembrión. Gyakorlatilag tehát nem kell számolnunk a tárolás alatti DNS károsodással. Számítások szerint egy mélyhűtött sejtpopulációt érő háttérsugárzás 32 000 év alatt éri el a D10 dózist, amelyet a sejteknek csak 10%-a él túl (Ashwood-Smith, 1986).

2.1.4. A spermát érő lehetséges károsodások és annak okai

A mélyhűtés során a spermiumokat elsősorban a nagyméretű jégkristályok képződésének és az ezáltal kiváltott sérüléseknek a veszélye fenyegeti. Az ilyen sérülések általában a sejtmembrán és sejtorganellumok roncsolódását jelentik. A sejtmembrán roncsolódását számos kutató leírta már. Cabrita és munkatársai (1998) szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) spermáját vizsgálva azt tapasztalta, hogy a felolvasztás után a sejtek nem több mint 20%-ánál maradt meg a membrán integritása, ám a spermiumok aktiválását követően ez az arány is csökkent. Drokin és munkatársai (1998) minőségi változásokat írtak le a szivárványos és sebes pisztráng (*Salmo trutta F. fario*) spermiumain. Mélyhűtés előtt a feji rész membránján megfigyelhető részecskék véletlenszerű elrendeződést mutattak. A felolvasztás után ugyanezek a részecskék kerek csoportokba rendeződtek a membrán felületén. A sebes pisztráng spermiumai nehezebben állították helyre a membránjuk integritását, mint a szivárványos pisztráng hímivarsejtjei. Természetesen a hűtőmédium és a hűtés egyéb paraméterei nagyban befolyásolják a spermiumokat érő károsodásokat és azok mértékét. A lesőharcsa (*Silurus glanis*) spermiumainak 90 százalékánál maradt ép a membrán és 47 százalékánál a mitokondriumok aktivitása szacharóz hígítóval és 10-15 % DMA-val történt hűtés esetén, míg más védőanyag alkalmazásával ez az arány jóval alacsonyabb maradt (Ogier de Baulny és mtsai., 1999).

Érthető, tehát, hogy a membrán integritása elsőrendű fontossággal bír a spermiumok életben maradása és termékenyítő képességük megőrzése szempontjából. Azonban sikerült kimutatni, hogy az afrikai harcsa mélyhűtött spermájával történt termékenyítés után a torz kelésű utódok aránya jóval magasabb volt, mint a friss spermával termékenyített kontrollcsoportban (Horváth és Urbányi, 2000). A torz kelés visszavezethető természetesen az ikra inkubációja közben az embriót ért mechanikai hatásokra is, ám ebben az esetben a kontrollcsoportban ugyanannyi torz lárvának kellene kelnie, mint a hűtött spermával termékenyített ikrából kikelő csoportokban. Felvetődik, tehát a kérdés, hogy mi lehet a torz kelésű lárvák ilyen magas arányának az oka? Mivel az embriók kifejlődtek és a lárvák

kikeltek, a spermiumok valószínűleg elvégezték élettani feladatukat, behatoltak a mikropylén és egyesültek a petesejt-membrán arra fogékony területével. Azonban hipotézisem szerint a teljes genetikai funkcióját már nem láthatta el a spermium, mivel elképzelhető, hogy a fagyás során az örökítőanyagot érte olyan károsodás, ami a képződő intracelluláris jégkristályokra vezethető vissza. Ezt látszik alátámasztani legfrissebb, még publikálatlan megfigyelésünk, hogy a kezelt csoportokban kelt rendellenes fejlődésű lárvák morfológiai szempontból erősen emlékeztetnek a genommanipulációs kísérletek haploid csoportjainak torz lárváira. Ez csak úgy képzelhető el, hogy az intracelluláris jég ugyanúgy roncsolja a spermiumok genetikai anyagát, ahogy a genommanipulációs kísérleteknél az ionizáló sugárzás is teszi. Ezt könnyítheti az a tényező is, hogy a halak spermiumában a kromatin messze nem olyan tömör szerkezetű, mint a fejlettebb gerincesekében, nem jellemző rájuk a később megjelenő lamelláris szerkezet (Bacetti és Afzelius, 1976).

2.2. KROMOSZÓMAPREPARÁLÁS

2.2.1. Kariotípus

A kariotípus elnevezés a kijevi G. A. Levitszkij professzortól származik 1924-ből (Imreh, 1986). A kariotípus a metafázisos (C-mitózisos) kromoszómaszerelvény minden jellemzőjét (kromoszómaszám, morfológia) összegző tulajdonsága. Segítségével megállapítható egy sejt, egyed, faj sajátos sejtmagi képe. A kromoszómaszám általában páros jegyű, hiszen egy testi sejt egy teljes apai és egy anyai garnitúrát tartalmaz. Rabl (1985) által született az első feltételezés, miszerint a fajok kariotípusa állandó (mely általánosságban valóban így van, de pl. a halaknál találunk kivételt (Várkonyi, 1997).

Általánosságban tehát megállapítható, hogy egy egyed kariotípusa az egész faj kariotípusát is jellemzi, kivéve az ivari kromoszómákat. Halaknál ez sem

annyira egyértelmű, ugyanis gyakori, hogy az ivart poligénes faktorok határozzák meg (Váradi, 2000).

A halak kariotípusa nem olyan általános érvényű, mint az emlősöké. A 24000 halfaj között találunk kivételt, ugyanis a fejlettebb halaknál egy nemzetségen, sőt egy fajon belül is léteznek diploid és poliploid állományok, tehát eltérő kariotípusú egyedek. Ilyenek például a páncélos harcsa (*Corydoras*), a csík (*Misgurnus*), a márna (*Barbus*), a ponty (*Cyprinus*) és a kárász (*Carassius*) nemzetségek egyes tagjai. Míg a hazai Cyprinus (*Cyprinus carpio*) és a Barbus (*B. barbus* és *B. meridionalis* fajok) nemzetség tagjait csak a tetraploid genetikai szerkezet, addig egyik kárászfajunkat (*C. auratus gibelio*) a diploid és poliploid vegyes állományok jellemzik. Ezek az élőlények földrajzilag elkülönülve élnek, vegyes populációk csak az élőhelyek találkozási pontjainál találhatóak (Váradi, 2000).

A halfajok kromoszómaszáma 2n=16 (néhány trópusi faj)-23 (pufferhal-fugu) és 174 (ingolafélék) között változik, egy kromoszóma mérete pedig kevesebb, mint 1 µm-től (ingolafélék) 30 µm-ig (néhány tüdőshal) terjedhet (Denton, 1973).

Ennél több kromoszómája van a tokféléknek, amelyeknél egyes fajok (*Acipenser sturio, A. ruthenus, Huso huso*) kb. 120, míg mások (*A. naccarii és A. gueldenstaedti*) kb. 240 kromoszómával rendelkeznek (Dettlaff és mtsai., 1993).

Olyan halfajok esetében, amelyek nagyszámú, kisméretű kromoszómával rendelkeznek, nehéz részletes kariológiai kép kialakítása. A legtöbb halfaj diploid kromoszómaszáma 40 és 60 közé esik, de pl. a pontyé 102±2 db (Chrisman és mtsai, 1990).

2.2.1.1. Kariotípus és az evolúció

Sajnos a halak kariotípusának magyarázata lényegesen lassabb ütemben fejlődik, mint az emlősöké. Sok esetben azok a technikák, amelyeket emlősökön, különösképp embereknél jól működtek, a halak vizsgálatánál csak csekély eredményt adtak. A kromoszóma garnitúra autoszómákat és heteromorfikus párokat

tartalmaz, amelyek lehetnek ivari kromoszómák, azonban ez nem minden esetben igaz. Az ivar néhány halfajban poligénesen meghatározott (McFeely, 1990).

A halak evolúciója során, beleértve az új fajok kialakulását is, főként bonyolult kromoszóma átrendeződési folyamatok és duplikációk figyelhetőek meg. A legtöbb primitív fajnál nagyszámú akrocentrikus kromoszóma számolható. Inverziók, deléciók, duplikációk és transzlokációk mind-mind közrejátszottak ezen osztály kialakulásában. A legáltalánosabb transzlokáció a halaknál a Robertson transzlokáció, melyben két, nem homológ kromoszóma kapcsolódik össze egy metacentrikus kromoszómát alkotva. A diploid kromoszómaszám a jellemző, azonban triploidok és tetraploidok kialakulása is lehetséges. Anaeuploidok is gyakorta megfigyelhetőek. A természetben nem tudunk haploidok vagy pentaploidok jelenlétéről, de kísérleti körülmények között előidézhetőek (Chrisman és mtsai, 1990).

Nagyszámú kísérlet során Ohno és Atkin (1966), illetve Ohno és munkatársai (1967, 1968, 1969) sem tudtak kapcsolatot találni a DNS mennyisége és a kromoszómák száma között halak esetében. A DNS mennyisége közötti különbségeket génduplikációval magyarázták. Feltételezték, hogy a primitív halak kariotípusa 48 akrocentrikus kromoszómát tartalmaz, melynek DNS tartalma megközelítőleg 20%-a az emlősökének. A diploid kromoszómaszámban lévő nagy különbségek ellenére a DNS tartalom meglehetősen állandó, szemben a méhlepényes emlősfajokkal.

A DNS mennyiségi változásának mechanizmusa a következőknek tudható be: a testvér-kromatidák közötti egyenlőtlen gén kicserélődésnek a mitózis során, a meiózis alatti egyenlőtlen crossing overnek a homológ kromoszómáknál, létszám feletti duplikáció specifikus kromoszómákon és a ploidiaszint növekedése az összes kromoszóma duplikációja miatt (McFeely, 1990).

Összehasonlítva a sejtmagban lévő DNS mennyiségét különböző állatfajoknál arra a következtetésre jutottak, hogy a nukleáris DNS masszívan növekedett az evolúció során a halak osztályának megjelenéséig (Goin és Goin, 1968). Mind a porcos, mind a csontos halak körében a DNS mennyisége magasabb a fejletlenebb formákban és alacsonyabb a fejlettebbekében. A deléció és a

transzlokáció a magyarázat erre a redukcióra, habár a halak az evolúciós lánc vége felé jelentek meg (McFeely, 1990).

2.2.2. A legfontosabb hazai halfajunk, a ponty (*Cyprinus carpio, L.)* kariológiai jellemzése

A kromoszóma preparátumok élő állatok kolchicines kezelésével készültek. A preparátumok készítéséhez tükrös és pikkelyes pontyokat használtak fel (Márián, 1978).

A *Cyprinus carpio* diploid kromoszómaszáma 102±2 db. A hetvenes évek elején határozták meg a ponty diploid kromoszómaszámát és 100-104 közötti 2n értékeket kaptak. A Cyprinidae családra általában a 2n=46-52 diploid kromoszóma a jellemző. Látható, hogy a ponty diploid kromoszómaszáma ezen értékeknek közel kétszerese, amely a poliploidizáció lehetőségét veti fel. Pontosabban feltételezni kell, hogy a ponty egy természetes tetraploid faj. Duplikációs relációt mutattak ki a Cyprinidae család tagjai között.

A poliploidizáció mellett szól az is, hogy a ponty keresztezhető legkönnyebben számos egyéb, a családba tartozó halfajjal, tehát genetikailag fellazult kariotípussal rendelkezik. Összefoglalva megállapítható a pontyról, hogy természetes tetraploid halfaj (Márián, 1978).

2.2.3. Kromoszómavizsgálati módszerek

A kromoszómavizsgálati módszerek alapját mindig az alábbi négy lépés alkotja:

1. Mitózis inhibítorral való kezelés

A kolchicin mikrotubulusroncsoló hatása nyomán a kromoszómák kiszabadulnak a mitotikus orsó fogságából. A kolchicines kezelés 0,05%-os

kolchicin oldatban 3 órán át tart Várkonyi esetében (1997), míg Kirankumar és Pandian 0,01%-os oldatot alkalmaz 6 órán keresztül (2004).

2. Hipotóniás kezelés

A szövetnedvek koncentrációjánál alacsonyabb töménységű oldat alkalmazásakor, az ozmotikus különbséget kiegyenlíteni törekvő, kívülről befelé áramló hígabb oldat felduzzasztja, majd szétpukkasztja a sejteket, ezáltal eltávolíthatjuk a sejthártyát és a citoplazmát. Az eljárást hipotóniás sokknak is szokták nevezni (Imreh, 1986). Halak esetében használhatunk desztillált vizet, valamint 0,3-0,4%-os KCl-oldatot (Várkonyi, 1997).

A hipotonizálás feltalálása előtt a kromoszómák, szó szerint idézve Imreh (1986) könyvéből, „egymás hegyén hátán" zsúfolódtak. A „hiptóniás csoda" mérföldkőnek számított a modern citogenetika történelmében. Hsu és Pommerat (1953) volt az, aki először írta le a hipotóniás kezelések hatását a sejt és szövettenyészetekben. A hipotonizálás hatására a metafázisos kromoszómacsoportok szétszóródnak, körvonalazhatóvá és láthatóvá válnak.

3. Fixálás

A fixálás feladata a hipotonizálással elért állapot rögzítése. A legáltalánosabban használt fixálószer a metanol:ecetsav 3:1 arányú keveréke. A fixálót mindig frissen kell készíteni, mivel az alkohol és a sav észteresedése miatt a rögzítő hatás romlik. A fixálást háromszor ismételjük (Várkonyi, 1997, Kirankumar és Pandian, 2004).

4. Festés

A festés célja, hogy a metafázisban leállított sejtosztódás során kipreparált kromoszómagarnitúrákat mikroszkópikusan értékelhetővé tegye. Erre leggyakrabban Giemsa festéket használnak ((Várkonyi, 1997; Kirankumar és Pandian, 2004).

2.2.3.1. Direkt módszer

Jó mitotikus kromoszómapreparátumok a hal különböző életszakaszaiban különböző módon, eltérő szövetekből nyerhetők. Osztódó sejtek gyűjtésére az egyik legjobb a direkt módszer.

Mivel gyorsan fejlődnek, kiváló osztódó sejtek gyűjthetők embriókból, illetve lárvákból. Ez egy elég egyszerű módszer, és magas mitotikus index mellett (osztódó sejtek / a lemezen lévő összes sejt) szépen terült kromoszómákat eredményez (Thorgaard és mtsai., 1981; Kirankumar és Pandian, 2004). A kísérlet során azonban fel kell áldozni az állatokat.

Kifejlett hal esetében szinte bármely szövet alkalmas mintavételre, eltérő eredménnyel. Gyűjthető osztódó sejt kolchicinnel kezelt veséből, májból, kopoltyúból, vékonybélből, lépből és az ivarszervekből. A belső szervekből készülő kromoszómapreparátumok elkészítésének lényege az, hogy az élő állat testébe injekciózzák a kolchicint, majd az állatot optimális körülmények között tartják 24-36 órán át. Kligerman és Bloom (1977) 25 μg kolchicin/gramm hal mennyiséget alkalmazott. Ezután az állatot leölik és a megfelelő szervet kiműtik.

Regenerálódó, tehát természetes módon nagyarányú osztódó sejtet tartalmazó szövetből, például úszóból, illetve pikkelyből igen jó eredményekkel készíthető preparátum és az állatot sem szükséges feláldozni, a módszer csak kis mértékű sérülést okoz. Regenerálódó úszóból való preparálás módja a következő: elaltatott hal farokúszójából 2 vagy több nappal a mintavétel előtt kell levágni egy darabot. Amikor a regenerálódó szövet láthatóvá válik, a halat anesztetizáljuk, majd a szövetet levágjuk és 2-3 órán át kolchicintartalmú közegben inkubáljuk. A hőmérsékletet az adott faj igényeihez kell beállítani. Ezután történik a hipotonizálás, a fixálás és a festés (Thorgaard és Disney, 1990). Denton és Howell (1969) és Ramirez (1980) jó eredményekkel készítettek kromoszómapreparátumokat pikkelyből kolchicin használatával és anélkül is.

A legjobb minőségű preparátumok veséből és lárvából készíthetők (Várkonyi, 1997). Általában elmondható, hogy a legcélravezetőbb és legeredményesebb az egészséges, gyorsan növekvő egyedekből vett szövetek

felhasználása, mert ezekben az egyedekben a legmagasabb az aktuálisan osztódó sejtek aránya.

2.2.3.2. Indirekt (szövettenyésztéses) módszer

Ha a mintákat nem rögtön használjuk fel és növelni szeretnénk az osztódó sejtek arányát, leukocita, azon belül limfocita kultúrát, illetve szövettenyésztést alkalmazhatunk (Thorgaard és Disney, 1990).

Halaknál a legcélravezetőbb módszer, amely mellett az állat is életben marad, a regenerálódó úszóból, vagy pikkelyből indítható fibroblaszt szövettenyészet.

Az úszómintákat alkohollal fertőtleníteni kell, majd apró darabokra vágva tripszinnel kezelni. A tripszines kezelésre azért van szükség, hogy az alkoholos lemosás után keletkezett elhalt felszíni réteget leemésszе. Ezután az úszódarabkákat steril szövettenyésztő edénybe helyezzük, és letapadásuk után feltöltjük szövettenyésztő tápoldattal. Négy hét alatt a fibroblasztréteg az edény alját befedi. Ezután kolchicin kezelés majd centrifugálás következik. Az üledéket hipotonizáljuk, ezután ismét centrifugálás következik. Majd fixálás és újabb centrifugálás után elkészíthető a preparátum (Thorgaard és Disney, 1990).

Megfigyelhető, hogy legnagyobb a növekedési potenciál embrionális szövetből készített sejtkultúrában, kisebb fejlődő halból készültben és a legkisebb kifejlett, ivarérett, illetve idős állat esetén (Wolf és Ahne, 1982).

A limfocita kultúra hatékony módszer a kromoszómaszám megállapítására nagyobb méretű halaknál, ha azt akarjuk, hogy az állat életben maradjon. Maga a módszer nagyjából ugyanaz, mint az emlős limfocita kultúráknál.

A leukociták normális állapotban nem osztódnak, ezért olyan médiumra van szükség, amely osztódásra stimulálja a sejteket. Ha ez sikerül, a leukocita kultúrák kiváló forrásai az osztódó sejteknek (Thorgaard és Disney, 1990). A legnagyobb nehézség a limfocita kultúráknál a médium pontos összetevőinek összeállítása.

Hartley és Horn (1983, cit. Thorgaard és Disney, 1990) dolgoztak ki először új, egyszerűbb és olcsóbb módszert a hagyományos limfocita kultúrából kiindulva a

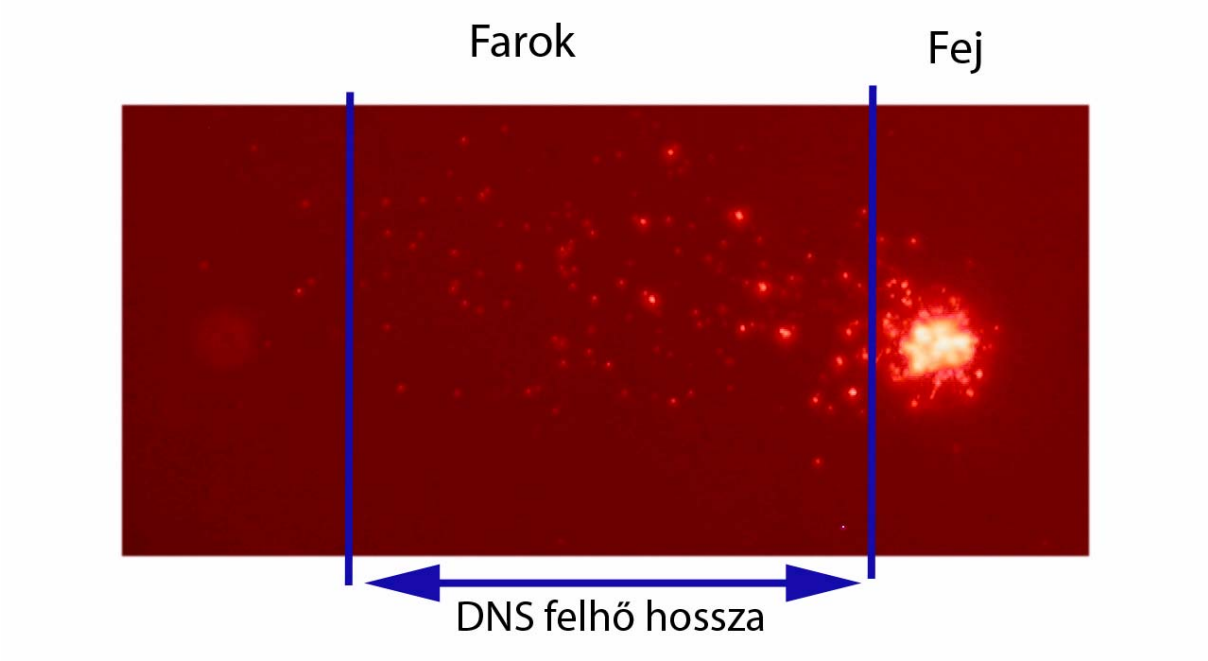
szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) elegendő számú metafázisos kromoszómáinak analizálására.

A módszer a következő: vérvétel után a vért tápoldattal rázzuk össze. A tenyésztési idő lejárta után kolchicint adunk hozzá és állni hagyjuk. Ezután következik a centrifugálás és az üledék hipotóniás kezelése, majd az így elkészített sejtszuszpenziót fixáljuk a már említett módon. A fixálóoldatot háromszor cseréljük. A sejtek ezen eljárást követően hónapokig tárolhatók.

Ez a módszer más halfajoknál is alkalmazható, bár nagyon fontos különbség az adott faj igényeihez igazított hőmérséklet. Leukocita kultúra készítését pontynál (Blaxhall, 1983) és csatornaharcsánál (Wolters és mtsai., 1981) is leírták (cit. Thorgaard és Disney, 1990).

2.3. A COMET MÓDSZER

Sokféle technika létezik a biológiai hatások (mikronukleáris, mutációs, szerkezeti kromoszóma abberáció) eredményeként keletkező DNS károsodásnak a kimutatására a szennyezést okozó anyag genetikai aktivitásának azonosításán keresztül. A nyolcvanas évek végén egy új vizsgálati módszert fejlesztettek ki, amely lehetővé teszi DNS károsodásának közvetlen becslését. Az üstökös módszer a folyamat végén kirajzolódó képről kapta a nevét, mivel a kép egy üstökösre (angolul: comet) hasonlít. Az üstökös egy feji és egy csóva vagy farok régióból áll (1. ábra).



1. ábra Az üstökös részei

Minél nagyobb károsodást szenvedett a sejt DNS állománya, annál kisebb lesz a feji rész és nagyobb arányú a csóva régió, ami az apróra töredezett DNS fragmentekből áll. Az ép DNS-sel rendelkező sejtek képe pontszerű marad.

Az üstökös vizsgálat vagy más néven egyetlen sejt gél elektroforézise gyors, egyszerű és rendkívül érzékeny mikroszkópos vizsgálatot is igénylő módszer, amellyel a DNS károsodását és a DNS helyreállítását lehet megvizsgálni az egyes sejtek szintjén. E módszer legfontosabb felhasználása a toxikológiához kötődik, a klinikai, genetikai toxikológiától kezdve, az oxigén hiány okozta károsodás mérésén át, egészen a molekuláris járványtanig.

Östling és Johanson (1984) tette meg az első lépéseket az egyedi sejt szintű DNS károsodások detektálására a mikrogél elektroforézis technikával. Módszerük szerint a sejteket agarózba ágyazva felviszik egy tárgylemezre, majd a sejteket felemésztik detergenssel és magas sótartalommal. Ezek után a semleges pH mellett a tiszta DNS-t elektroforetizálják. A mindkét szálra kiterjedő törést szenvedett sejtek DNS-e az anód felé vándorol. Az elvándorolt DNS tartalmat ethidium-

bromidos festéssel teszik láthatóvá vagy a fluoreszencia intenzitását, mérik mikroszkópra szerelt fotométerrel.

Singh és munkatársai (1988) továbbfejlesztették a mikrogél technikát lúgos kémhatáson (pH>13) zajló elektroforézissel a DNS károsodás mérésére egyedi sejteknél. Egy évvel később Olive (1989) bevezetett egy másfajta lúgos verzióját a módszernek, amelyben a DNS-t pH 12,3 körüli értéken elektroforetizálják.

Az üstökös vizsgálat 1988-as kidolgozása óta számos eredmény támasztja alá a módszer hasznosságát és jó alkalmazhatóságát a különböző DNS károsodások detektálására. Jól használható ez a módszer például az egyes és kettes DNS szál törések vizsgálatára, oxidatív DNS károsodások és DNS-DNS, DNS-fehérje és DNS-egyéb anyagok, például vegyszerek keresztkapcsolódásának felderítésére.

A módszer lehetővé teszi a DNS károsodás mérését és elemzését is az eukarióta és bizonyos esetekben a prokarióta sejteken is. Jól használható a takarmányozástan tudományában, de akár hypoxia következményének becslésére az orvostudományban. Nagyszerűen alkalmazható élőhelyek állapotának felmérésében, így kiváló módszer a természet- vagy környezetvédők számára például egy vízszennyezés hatástanulmányának készítésekor.

A comet módszer lúgos (pH>13) kémhatáson végzett 1988-as bevezetése óta számos kutató által és igen széles körben alkalmazott módszerré vált (Olive, 1989; Tice, 1995; Rojas és mtsai, 1999). Egyéb genotoxikológiai módszerekkel összehasonlítva a következő előnyöket emelhetjük ki:

- alacsony szintű DNS károsodás is láthatóan kimutatható,
- elegendő alacsony sejtszám mintánként,
- rugalmas módszer,
- könnyen kivitelezhető,
- alacsony költségű,
- tudományos közlemények kiadásának lehetősége viszonylag kevés minta anyagból,
- viszonylag rövid idő (néhány nap) alatt lefolytatható egy egész kísérletsorozat.

Az utolsó évtizedben felfedezték ezt a módszert az alapkutatást végző szakemberek számára, akik széles körben a humán és környezeti biomonitoringon át a DNS kijavítódáson keresztül a genetikai toxikológiáig alkalmazzák. Általános áttekintését a tecnikának Tice és kollégái (1991), McKelvey-Martin és kutatócsoportjuk (1993), Tice (1995), Fairbairn és munkatársai (1995), Anderson és munkatársai (1994), Rojas és kollégái (1999) foglalták össze.

Genotoxikológiai tesztként a comet assay használható human mutagének és karciómák azonosítására (Anderson és mtsai.,1994). Habár a tökéletes korreláció még nem várható a tesztek során. A korreláció a vegyszer osztályától és a karcinogén anyagok bonyolult kapcsolatából adódik.

A módszer nem igényel túl bonyolult felszerelést, mindössze egy gél elektroforézis készülékre és egy fluoreszcens mikroszkópra van szükség. A módszer alkalmazása során a mintát agarózzal keverik és két réteg agaróz közé ágyazzák be egy tárgylemezen. Egy sikeres alkalmazás szerint a tárgylemezeket 1-1,5%-os olvasztott agarózzal vonják be, majd szobahőmérsékleten, esetleg szárítószekrényben szilárdítják meg. A második réteg agarózt, mely 0,5-1%-os, a sejtszuszpenzióval keverve néhány nap múlva viszik fel. A gélréteget azonnal fedőlemezzel borítják be, majd legalább 5 percre fagyos felületre helyezik, az agaróz megszilárdításának elősegítésére. Ezután eltávolítják a fedőlemezt, rácseppentik a harmadik réteghez szükséges agarózt és ismét fedőlemezzel takarják be és 5 percre fagyos felületre helyezik (Tice és mtsai., 2000). A harmadik agarózréteg kitölti a lehetséges felületi egyenetlenségeket, azonban sok esetben könnyen leválik és magával húzza a mintával elkevert második gélréteget is, így a lemez értékelhetetlenné válik. Ebből kifolyólag ismertek olyan technikák, melynek során az utolsó gélréteg használatát mellőzik. Az utóbbi években speciális tárgylemezeket is használnak, amelynek a felületén biztonságosabban marad meg az agaróz réteg (Klaude és mtsai., 1996). A sikeres analízishez igen fontos paraméter az agarózba kevert sejtek koncentrációja, ugyanúgy, mint az agarózrétegek koncentrációja. A magas agaróz koncentráció befolyásolja a DNS migrációját. A sejtek optimális száma nem haladhatja meg a néhány darabot látóterenként, mivel ha túl sűrű a minta az értékelés nehézkessé válhat.

Miután eltelt az 5 perc a fedőlemezek eltávolítását követően, a lemezeket minimum 1 órára magas só és detergens tartalmú, úgynevezett lízis oldatba helyezik. Az eredeti, Singh és munkatársai (1988) által használt lízisoldat összetétele a következő: 100 mM EDTA, 2,5 mM $NaCl_2$, 1 % N-lauroylsarcosine és 10 mM Trizma pH 10 mellett. Közvetlenül a felhasználás előtt még 1% Triton X-100-at adtak az oldathoz. A lízis oldathoz adott 10% DMSO megelőzi a szabadgyökök által indukált DNS károsodást, amit a lízis során az eritrocitákból felszabaduló vas okoz (Tice és mtsai., 1991). McKelvey–Martin és kollégái (1993) arról számoltak be, hogy a lízis oldatból elhagyható a N-lauroylsarcosine. Habár ez nagymértékben függ a mintáktól, néhány esetben szükséges mindkét detergens alkalmazása a tökéletes lízishez. A lízis során a DNS-ről leemésztődik a sejtfehérje. A lízis ideje tanulmányoktól függően 1 órától akár hetekig, hónapokig is tarthat.

A lízis oldatból sötét helységben kiemelik a lemezeket és lecsepegtetik. A lízist követi a kicsavarodás fázis, melyhez a lemezeket lúgos kémhatású elektroforézis oldatban inkubálják, hogy az egyes száltöréseket és a lúgos kémhatásra érzékeny helyeket (Alkali Labile Sites-ALS) kimutassák. A lúgos oldat Singh és kollégái (1988) alapján: 1 mM EDTA és 300 mM NaOH, pH>13. A legtöbb kísérletben máig ezt az oldatot használják, mivel ez maximalizálja az egyes száltörések és az ALS kimutathatóságát. Az inkubációs idő az eredeti, Singh-féle (1988) protokoll szerint 20 perc, azonban humán limfocitán végzett kísérleteknél akár 60 perc is lehet (Vijayalaxmi és mtsai., 1992). Rövidebb kicsavarodási idő szükséges a kettős száltörések kimutatására, mint az egyes száltörések detektálására.

Ezt követi az elektroforézis, amely során a beállítás értékei szigorúan meghatározottak. Singh (1988) munkája alapján az elektroforézis 25 V és 300 mA, ideje 20 perc. Ciereszko és kollégái kísérleteiben az elektroforézis hasonló paraméterekkel, de 30 percig tartott tokfélék esetében (Ciereszko és mtsai, 2006). A feszültség függ az elektroforézis kád méretétől, általában 0,7-1,0 V/cm értéket alkalmaznak. A kísérleti laboratórium hőmérséklete 5-25 ºC közötti legyen, mert alacsony hőmérséklet mellett jobb az ismételhetőség. Mind a lízis, mind az elekroforézis erősen lúgos körülmények között zajlik. A lízis pH 10 körüli értéken megy végbe, az elektroforézis akár elérheti a 13-as pH-t is. Ha az elektroforézis

erősen lúgos pH mellett zajlik, akkor az egyes DNS száltöréseket vizsgálhatjuk. Ha semleges pH-jú elektroforézis oldatot alkalmazunk, akkor inkább a kettős DNS töréseket tudjuk vizsgálni. Az elektroforézis során a méretbeli különbségekből adódóan a sérült DNS fragmentek elvándorolnak a sejtmagtól.

Az elektroforézis idő lejárta után, még mindig sötét helységben kiemelik a lemezeket az elektroforézis kádból és egy vízszintes rácsra helyezik azokat. A gél felületéről el kell távolítani a lúgot, ezért megfelelő, úgynevezett semlegesítő pufferral kell átöblíteni. Singh és mtsai (1988) leírása alapján 3 ismétlésben 5-5 percig tartson a semlegesítés Trizma pufferral. Rojas (1999) szerint a hosszabb ideig tartó és gyakoribb öblítés hasznos lehet, ha a lemezek kiértékelésekor nagy a háttérzaj. Ciereszko és kollégái (2006) az elektroforézis után a lemezeket etanolba merítették, majd levegőn megszárítva megfestették .

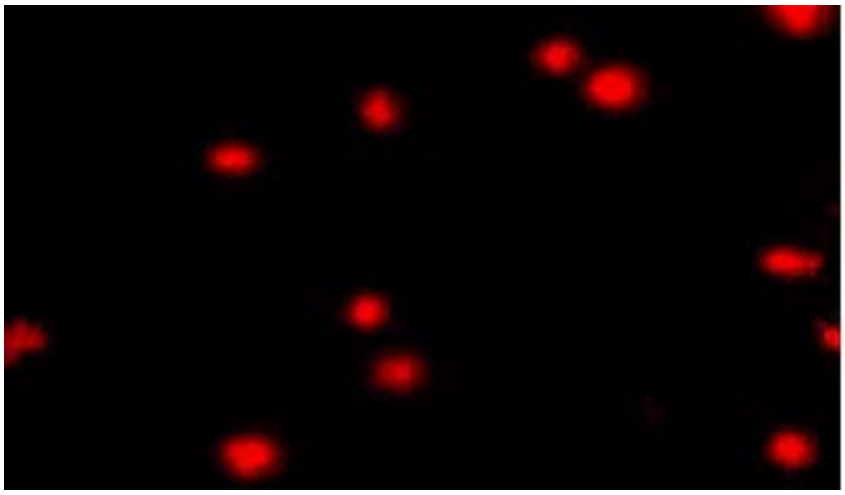
A következő lépés a tárgylemezek festése valamilyen fluoreszcens festékkel, például ethidium-bromiddal, amely a legelterjedtebb (Östling és Johanson, 1984; Singh és mtsai., 1988). A következő festékek használhatóak még: SYBR zöld (Tice és mtsai., 1998, Ciereszko és mtsai, 2006), YoYo Dye (Gedik és mtsai, 1992) és propidium jodid (Olive, 1989). A jól festődött minták fluoreszcens mikroszkóppal vizsgálhatóak vagy szárítás és tárolás után később kerül sor az elemzésükre. Ebben az esetben a tárgylemezeket etanolba vagy metanolba áztatják néhány percre, hogy dehidratálódjanak (Gurugunta és mtsai., 1996; Klaude és mtsai., 1996). Hosszabb idejű tárolás előtt pár másodperces formalinos fürdő segít stabilizálni a gélt. A nem fluoreszencián alapuló technikák ezüst-nitrátos festést alkalmaznak (Kizilian és mtsai, 1999). Az üstökösök képét 160-600-szoros és 200-400-szoros nagyításon vizsgálják. A nagyítás megválasztása függ a sejtek típusától és a migráció mértékétől, korlátja a mikroszkóp vagy a képalkotó rendszer adta lehetőségek.

Minden lemezt, beleértve a pozitív és negatív kontrollokat is, kóddal látják el a mikroszkópikus analízis előtt a kódok jelentésének ismerete nélkül. A DNS migráció mérésére számos lehetőség van, szinte minden kutató, kutatócsoport más és mást alkalmaz.

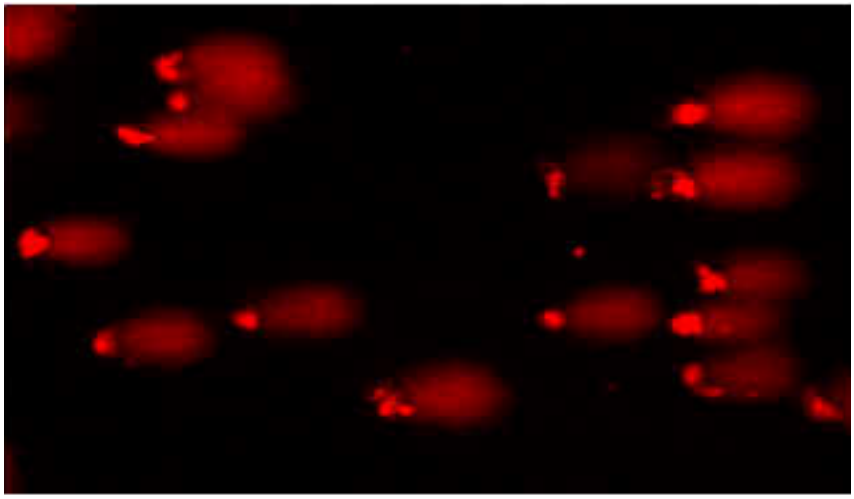
A képek analízise történhet vizuális és számítógépes értékeléssel. A sejtek lehetnek épek és sérültek. Az üstökösöket általában 4 vagy 5 kategóriába sorolják

az elvándorlás hossza és/vagy az üstökös csóva részében lévő DNS relatív aránya alapján (Gedik és mtsai., 1992; Anderson és mtsai., 1994).

Kobayashi és munkatársai (1995) vizuális osztályozása a következő 5 féle kategóriát különbözteti meg. Az I. típus az ép, nem károsodott sejtet jelöli, míg az V. a teljesen károsodott DNS-t. (2. és 3. ábra) A vizuális analízis rendkívül gyors és nem igényel számítógépes, illetve szoftveres hátteret, azonban az értékelésnek ez a módja nagy gyakorlatot kíván.



2. ábra Ép sejtek, I kategória



3. ábra Erősen károsodott, V. fokozatú sejtek

Számítógépes értékeléskor szoftver végzi el a minták osztályokba sorolását. Gyors, egyszerű és uniformizált rendszer. Böcker és kollégái (1999) kidolgozták a teljesen automatizált módszert az üstökösök értékelésére. A különböző szoftverek akár 30 féle tulajdonság analízisét is lehetővé teszik. A következő paraméterek használata a leginkább általános:

A) A csóva százalékos DNS tartalma, azaz a DNS hány százaléka vándorolt el a sejtmagtól.
B) Csóva hossza, azaz a fej és az utolsó fragment távolsága.
C) Csóva együttható, azaz a csóva hossza szorozva a csóva %-os DNS tartalmával.

A comet módszerrel foglalkozó tanulmányokban a DNS migráció mérése leggyakrabban mikronban történik.

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. KÍSÉRLETEK AFRIKAI HARCSA FAJON

3.1.1. A kísérleti halak beszerzése és tartása

A kísérletekhez használt afrikai harcsa állományt a szarvasi Halászati és Öntözési Kutatóintézet és a százhalombattai Temperáltvizű Halszaporító és Kereskedelmi Kft. biztosította. Az állatok ivar szerint különválogatva, 600 literes műanyag kádakban kerültek elhelyezésre Gödöllőn, a Halgazdálkodási Tanszék épületében. Az állatok etetését mélyhűtve tárolt razbórával, illetve granulált harcsatáppal (Haltáp Kft., Szarvas) oldottam meg. A halak tárolására szolgáló víz 24-28°C-os hőmérsékletét kiegészítő fűtőtestekkel biztosítottam. A megfelelő vízminőséget és víztisztaságot vízcserével, illetve szivacsos szűrőberendezéssel értem el.

4. ábra Afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) pár

3.1.2. Az ivartermékek elvétele

3.1.2.1. Az oltás

A halaktól az ivarterméket hormonkezelés útján nyertem ki. A tejesek dózisa 1 egység/testtömeg kg Ovopel volt (egy egység tartalmaz 20 µg emlős D-Ala^{6,} Pro^{9}NEt GnRH analógot és 20 mg metocloramid dopamin receptor antagonistát, Interfish Kft, Budapest) 24 órával a tervezett fejés előtt, míg az ikrásokat ugyanezzel a dózissal, de 12 órával a fejés előtt kezeltem. Az elkészített hormon-szuszpenziót steril orvosi fecskendővel és tűvel a halak hasüregébe jutattam. A tejeseket is hasonlóképp oltottam. A kiválasztott egyedeket a fejésig 26°C hőmérsékletű vizet tartalmazó kisméretű műanyag ládákban helyeztem el. Az inkubációs idő 12 óra, ezt követően az állatok készen álltak a fejésre.

3.1.2.2. A sperma kinyerése és minősítése

A tejes afrikai harcsa fejése ugyan lehetséges, de anatómiai sajátosságai miatt igen csekély mértékű hím ivartermék nyerhető, így szükségessé válik a herék műtéti úton történő eltávolítása (Rurangwa és mtsai, 2004). A halakat szegfűszegolajjal altattam el (10 csepp olaj 10 liter vízben), majd a hasüreget szikével felvágva eltávolítottam az egyik herét. Ezután a hasfalat visszavarrtam és a halat elkülönítve tartottam néhány napig, hogy nyomonkövethető legyen a felépülése. A kioperált heréket papírvattával szárazra töröltem, majd felhasználásig száraz petri-csészében, 4°C-on hűtőszekrényben tároltam. A kísérlet során a heréket ollóval feldaraboltam, majd egy félbehajtott gézlapon át kipréseltem a spermát.

A spermából mintát vettem (natív sperma) és vízzel való aktiválás után 400-szoros nagyításon fénymikroszkóppal megvizsgáltam a minőségét. Szubjektív módon megállapítottam a haladó mozgást végző spermiumok %-os arányát, a haladó mozgás idejét (másodpercben) és a mozgás intenzitását. A négy

legmagasabb motilitást, legalább 80-90%-ot elérő mintákat használtam fel, melyeket összekevertem.

3.1.3. A spermamélyhűtés folyamata

3.1.3.1. A sperma hígítása hűtőmédiummal

A hűtőmédium két összetevője a hígító és a fagyásvédő anyag.

Korábbi kísérletek megállapították, hogy afrikai harcsa esetében a mélyhűtést követő felolvasztás után a legnagyobb motilitás 6% fruktóz alapú hígítóval és 10% DMSO (Reanal, ref. szám: 20740-1-01-65), illetve 10% metanol (Reanal, ref. szám: 08860-1-08-65) fagyásvédő anyag alkalmazását követően érhető el (Horváth és Urbányi, 2000). A hűtőmédium pH-ját 7,73-ra állítottam be, amely érték megegyezik az afrikai harcsa szeminális folyadékának pH-értékével (Steyn és Van Vuren, 1987). Ehhez 1 M-os $NaHCO_3$ oldatot használtam. A hűtőmédiumokat alacsony hőmérsékleten, hűtőszekrényben tároltam a védőanyag toxicitásának csökkentése érdekében.

A harcsasperma hígítását a hűtőmédiummal 1:1 arányban, kémcsőben vagy Eppendorf-csövekben végeztem el. A mintákat ezután különböző méretű (0,25 ml; 0,5 ml; 1,2 ml) műszalmákba szívtam fel.

DMSO fagyásvédő anyag alkalmazásakor szükség van equilibrációs időre. A védőanyag kiegyenlítődése az extracelluláris és intracelluláris tér között 10 perc alatt megtörténik. Az equilibráció idejére ezeket a mintákat hűtőszekrénybe helyeztem, ezzel is csökkentve a toxikus hatást.

3.1.3.2. A sperma hűtése

A hűtést folyékony nitrogén gőzében végeztem. A folyékony nitrogén felszínétől megfelelő magasságra helyeztem el a szalmákat, amelyet különböző magasságú hungarocell keretek segítségével oldottam meg. A műszalmák mérete alapján állítottam be a hűtési időt és a hűtési magasságot. A hűtési idő mindhárom

szalmaméretnél 3 perc volt, a hűtési magasság 4 cm a 0,25 ml-es szalma esetében és 3 cm a két nagyobb méretű szalma esetében. A hűtési idő lejárta után a nitrogénbe dobtam a szalmákat. A mintákat kaniszteres kannákban, folyékony nitrogénben mínusz 196ºC-on tároltam.

3.1.3.3. Felolvasztás

A műszalmákban lévő sperma felolvasztását 40°C-os vízfürdőben végeztem a következők szerint: 0,25 ml-es szalma 5 másodperc, 0,5 ml-es szalma 13 másodperc, 1,2 ml-es szalma 20 másodperc. Ezután kivettem a szalmákat, ollóval levágtam az egyik végüket és a tartalmukat Eppendorf-csövekbe adagoltam ki.

Felolvasztás után ismét motilitás vizsgálatot végeztem és a spermát azonnal felhasználtam.

3.1.3.4. Az ikrások fejése

A hormonkezelt afrikai harcsákat az oltás után 12 órával fejtem. Az ivartermék elvétele az ivarnyílás szárazra törlése után a hasfalra gyakorolt kaudális irányú nyomással történt. A sikeresen kezelt nőstények ikráit száraz műanyag tálba fejtem és letakarva szobahőmérsékleten tároltam, törekedve a minél hamarabbi felhasználásra. Vizuális értékelés után, ahol a fő szempont az ikra vértől és bélsártól való mentessége volt, kiválasztottam a két legjobb ikratételt és ezeket összekevertem.

3.1.3.5. Termékenyítés és keltetés mélyhűtött, illetve natív spermával

A termékenyítéshez az ikrát kis műanyag edényekbe, 15 grammos adagokra osztottam szét, 1 adagot 0,125 ml friss spermával termékenyítettem, ez volt a kontroll csoport. A többihez a különböző méretű és különböző hűtőmédiummal mélyhűtött műszalmákból nyert spermát adtam. Elegendő ikra esetén így 7 mintát lehetett kialakítani. (0,25 D; 0,25 M; 0,5 D; 0,5 M; 1,2 D; 1,2 M; kontroll, ahol D: DMSO, M: metanol, a számok pedig a műszalmák méretét jelzik ml-ben). Az ivartermékek összekeverése után az aktivációt keltetőházi vízzel végeztem az edények finom mozgatása közben. Az ikrahéj animális pólus felőli felszíne ragadós, de ezt a ragadósságot nem szükséges megszűntetni, mert a keltetés során beavatkozás nélkül megszűnik (Péteri és mtsai., 1989).

A termékenyülési százalék megállapítását vízhőmérséklettől függően 1-1,5 órával a termékenyítés után, 2-4-8 sejtes állapotban végeztem el.

A termékenyített adagokból mintát vettem és mikroszkóp alatt számoltam meg a nem termékenyült, torz, illetve a látótérben lévő összes ikraszemet. Időközben fontos a többszöri vízcsere. A számolást 3 látótérben, tehát 3× ismételtem meg. Ebből átlagot számolva állapítottam meg a termékenyülési arányt.

A vizsgálat után az inkubáció 1 literes Zuger üvegekben zajlott, a laboratóriumban fenntartott keltetőházi rendszerben. Az ikrák inkubációja meleg környezetben, 26°C-os vízhőfok mellett 24-25 óráig tartott.

A kísérleteket 5 ismétlésben folytattam le.

3.1.4. Kromoszómavizsgálat

3.1.4.1. A vizsgálat előkészítése

A kromoszómák vizsgálatát nemtáplálkozó lárva stádiumban végeztem el, mivel a legjobb minőségű preparátumok lárvákból készíthetők. Ennek oka, hogy a frissen kelt lárvákban az osztódási folyamatok igen gyorsak. Kelés után az átlátszó lárvákat műanyag tálkákba engedtem le a Zuger üvegekből.

Ezután megvizsgáltam a kelési arányt. A számolást ebben az esetben is 3 látótérben háromszor ismételtem meg, majd meghatároztam a kelési százalékot. Továbbá leszámoltam a torz lárvákat is, és kiszámítottam a százalékos arányukat az összes kikelt lárva mennyiségéhaz viszonyítva.

A natív spermával termékenyített kontroll csoportból 50-100 db ép és ugyanennyi torz lárvát válogattam ki, amelyeket külön edénybe helyeztem, tehát a továbbiakban egy ép és egy torz kontroll csoporttal dolgoztam.

A többi csoportból 50-100 rendellenes fejlődésű lárvát válogattam ki. A mintákat megfelelő mennyiségű vízzel, petri-csészében helyeztem el.

3.1.4.2. Kromoszóma-preparálás direkt módszerrel

A kiválogatott lárvákat mitózis inhibitorral kezeltem. Az inkubálást 0,05%-os kolchicin (Sigma Aldrich, ref. szám: C180) oldatban végeztem 3 órán át. A kolchicin működésképtelenné teszi az osztódási orsót, így az osztódás metafázisban leáll. A lárvákat 0,075 M KCl oldatban 25 percig hipotonizáltam. Ezután pipetta segítségével választottam le a szikzacskót.

A fixáló oldatot frissen készítettem kémcsőben metanol:ecetsav (Reanal, ref. szám: 09215-0-01-47) 3:1 arányú keverékéből. A hipotóniás oldatból pipettával helyeztem át a lárvákat a fixálóba. Ezután a fixáló oldatot 20 percenként 3× lecseréltem. A lárvák a fixálás során teljesen elveszítik színüket, fehéres-átlátszóvá válnak. A fixálás után a minták azonnal felhasználhatóak, vagy rövid ideig hűtőszekrényben 4°C-on tárolhatóak.

A preparátum készítéséhez kivettem egy lárvát a fixálóból és óraüvegen hagytam felszáradni. Frissen készített 50%-os ecetsav oldatból 0,015-0,02 ml–t rácseppentettem és bonctű segítségével szuszpendáltam. Eközben a tárgylemezeket 50°C-os tárgylemez-melegítőn előmelegítettem (a tárgylemezeket korábban sorszámmal, hűtőmédiumot, és szalmaméretet jelző rövidítéssel jelöltem).

A sejtszuszpenziót a tárgylemezre cseppentettem. Néhány másodpercig hagytam száradni, majd visszaszívtam a pipettával és ismét kicseppentettem. Ezt 6-8 alkalommal megismételtem az adott tárgylemezen.

Egy csoportból 30 lemezt készítettem. A lemezeket szobahőmérsékleten megszárítottam, majd 4%-os Giemsa (Riedel-de Haen, Germany, ref. szám: 32884) oldatban 8 percig festettem.

3.1.4.3. Kromoszómaszámlálás

A megfestett és megszárított tárgylemezeket 1000-szeres nagyításon Nikon Eclipse E600-as mikroszkóp segítségével vizsgáltam. Egy preparátumon a lehető legtöbb (minimum 30) jól terült metafázisban számoltam meg a kromoszómák mennyiségét. A mikroszkópos felvételeket 1000-szeres nagyítás mellett Nikon Eclipse E600 típusú mikroszkópra szerelt Nikon Coolpix 4500 digitális fényképezőgéppel készítettem.

3.2. KÍSÉRLETEK PONTY FAJON

3.2.1. Nagyméretű műszalmák használatának tesztelése

3.2.1.1. A kísérleti állatok tartása

A kísérletekhez felhasznált állatokat a Haltermelők Országos Szövetsége és Terméktanácsának Dinnyési Ivadéknevelő Tógazdasága biztosította. Az állatokat a telelők lehalászását követően morfológiai bélyegek (szaporításra való felkészültség, sérülésmentes testfelület) alapján választották ki és szállították be a keltetőházba. A kísérlethez a tenyészállatokat 48 órával a tervezett fejés előtt halászták le a tavakból és szállították be a keltetőházba, hogy a halaknak legyen lehetősége akklimatizálódni. Itt ivar szerint szétválasztva tároltam őket, kísérletemhez 5 ikrás és 5 tejes egyedet választottam ki.

5. ábra Kifejlett pikkelyes ponty (*Cyprinus carpio*)

3.2.1.2. Az egyedek oltása

Az ivartermék kinyerése érdekében hormonális indukciót alkalmaztam. Az ovuláció és a spermiáció indukciójához Ovopel hormonkészítményt (Interfish Kft.) használtam mind a tejeseknél, mind az ikrásoknál. A tejesek dózisa 1 egység/testtömeg kg volt, 24 órával a tervezett fejés előtt, míg az ikrásokat ugyanezzel a dózissal, de két adagban (előadag: a teljes dózis 10%-a 24 órával a tervezett fejés előtt, döntőadag: a hátramaradó 90%, 12 órával a fejés előtt) kezeltem. A hormonkészítményt halfiziológiás sóoldatban (0,65%-os NaCl) szuszpendáltam.

Az így nyert szuszpenziót steril orvosi fecskendő segítségével a halak hasüregébe injektáltam, a hasúszó eredési pontjánál.

3.2.1.3. A tejesek fejése

A halakat altatóoldatot (Quinaldin, Reanal) tartalmazó kádba helyeztem, majd mikor a halak megfelelően elbódultak, kivettem őket, fejüket letakartam és ivarnyílásukat szárazra töröltem. Ezek után műanyag kémcsövekbe történt a sperma lefejése, ügyelve arra, hogy vér és vizelet ne szennyezze az ivarterméket.

Ezt követte a sperma vizsgálata, melynek során a haladó mozgást végző spermiumok %-os arányát (a sperma motilitását) vizsgáltam. Amennyiben a sperma minősége megfelelő volt (minimum 70-80%-os motilitás esetén) felhasználtam. A kémcsöveket hűtőszekrényben tároltam a mielőbbi felhasználásig.

3.2.1.4. A sperma mélyhűtése

Hígítóként 350 mM glükózt és 30 mM Tris-t (Sigma Aldrich, ref.szám: T-6791) tartalmazó oldatot készítettem. Védőanyagként 10% metanolt használtam végső koncentrációban.

A hígítási arány 1:9 volt. A felhígított spermát különböző méretű műszalmákba (1,2 és 4 ml) szívtam fel és hungarocell dobozban, folyékony nitrogén gőzében hűtöttem le. A hűtés magassága 3 cm, ideje pedig 4 perc volt a 1,2 ml-es, illetve 5 perc a 4 ml-es műszalma esetében. A lehűtött mintákat felhasználásukig folyékony nitrogénben kaniszteres kannában tároltam.

3.2.1.5. Az ikrások fejése

Hormonális kezelést követően fontos szempont, hogy az ovuláló halak ne szórják el ikrájukat a tartómedence padlójára, így ezt a problémát a keltetőházi gyakorlatnak megfelelően az ivarnyílás bevarrásával oldottam meg.

Így a halak elaltatása és hasfaluk szárazra törlése után eltávolítottam a varratokat. Ezután az ivarnyílást szárazra töröltem, és a hasfalra gyakorolt kaudális irányú határozott, de egyben óvatos nyomással száraz műanyag tálakba fejtem le az ikrát.

3.2.1.6. A mélyhűtött spermával történő termékenyítés

A szalmákat 40°C-os vízfürdőben olvasztottam fel, szalmamérettől függően 20 (1,2 ml-es műszalma esetén) és 30 (4 ml-es műszalma esetén) másodpercig. A felolvasztott sperma motilitását 400-szoros nagyítás mellett vizsgáltam a friss spermánál alkalmazott módszerrel.

A lefejt ikrából 10, 20, 30 grammos mennyiségeket (1,2 ml-es szalma), illetve 40, 80, 120 grammos mennyiségeket (4 ml-es szalma) adagoltam ki száraz műanyag edényekbe. Az 1,2 ml-es műszalma 1 ml hígított spermát tartalmazott. Tehát az irányadónak tekintett 0,5 ml szalma/10 g ikra arányhoz képest ½-szeres, 1-szeres, és 1½-szeres ikraadagokat használtam. Az ikraadagokon vizes termékenyítést alkalmaztam: az ikrához először 1 ml állott tóvizet adtam, majd azután a felolvasztott spermát. A termékenyítést követő 1-2 perces keverés után hozzáadtam a Woynárovich-féle oldatot (0,3% karbamid, 0,4% NaCl), melyben 1 órán át folyamatos keverés mellett duzzasztottam az ikratételeket.

A ragadósság elvételének utolsó fázisa a 0,05 %-os tanninos fürdő volt kétszer 20 másodpercig. Az ikrákat ezután 7 literes Zuger edényekben inkubáltam. Keléskor meghatároztam a kelési százalékot, valamint a torz fejlődésű lárvák arányát az összes kikelt lárvához képest.

A kísérleteket 4 ismétlésben végeztem el.

3.2.1.7. Kromoszómavizsgálat

A kromoszómavizsgálat az afrikai harcsánál leírt módon zajlott.

3.2.1.8. Az adatok statisztikai feldolgozása

A kapott eredményeket a GraphPad Prism 4.0 for Windows statisztikai szoftvercsomag segítségével elemeztem. Kétszempontos varianciaanalízissel $p \leq 0,05$ szignifikanciaszint mellett vizsgáltam, hogy a műszalma méretének, illetve a

felhasznált ikra mennyiségének van-e szignifikáns hatása a kelési eredményekre, illetve a torz lárvák arányára.

3.2.2. Különböző hűtőmédiumok vizsgálata ponty spermamélyhűtésének optimlizálására

3.2.2.1. A hűtés menete, előkészítése

Az egyedek oltása, a tejesek és ikrások fejése az előző kísérlethez hasonlóan folyt.

Hűtés előtt a spermiumokat 1:9-hez hígítottam a következő arányban:

1 adag sperma
1 adag védőanyag
8 adag hígító

Az alábbi hígítókat használtam fel:

1. 350 mM glükóz 30 mM Tris (pH 8.0)
2. 350 mM fruktóz 30 mM Tris (pH 8.0)
3. 300 mM szacharóz 30 mM Tris (pH 8.0)
4. 200 mM KCl 30 mM Tris (pH 8.0)
5. Ponty hígító (Magyary és mtsai., 1996), amely 1000 ml-re tartalmazott: 350 mg NaCl, 1000 mg KCl, 22 mg $MgCl_2$, 20 mg $NaHCO_3$

Védőanyagként 10% DMSO és 10% metanolt használtam végső koncentrációban.

A mélyhűtésig a spermiumokat 4ºC körüli hőmérsékleten hűtőben tároltam. A 2 védőanyag és az 5 különböző hígító 10 kombinációt adott összesen. Így a hűtésre szolgáló műszalmákat különböző színű és számú csíkozással láttam el, és mindegyik kombinációból 4 ismétlést végeztem. A mintákat 0,5 ml-es

műszalmákba automata pipettával szívtam fel. A DMSO-s minták esetében 10 perces equilibrációs idővel dolgoztam, míg a metanolos minták hűtését azonnal elvégeztem.

A hűtés hordozható hungarocell dobozban, folyékony nitrogén gőzében történt. A műszalmákat a folyékony nitrogén szintjén úszó 3 cm magas hungarocell kereten helyeztem el, majd 3 perc elteltével a nitrogénbe dobtam a mintákat.

A hűtés után azonnal megkezdtem a minták felolvasztását a motilitás vizsgálata céljából, ami 40 ºC-os vízfürdőben történt 13 másodpercig. Minden mintánál megvizsgáltam a minták vízzel való aktiválhatóságát és a haladó mozgást végző spermiumok %-os arányát.

3.2.2.2. A mélyhűtött spermával történő termékenyítés

A nőstényektől nyert ikrát először 10 g-os adagokba mértem ki, ami kb. 8000 db ikrát jelent, és ezt száraz műanyag edényekbe tettem. Ezután az ikrához 2-3 ml vizet adtam, majd a felolvasztott spermát.

A termékenyítés további lépései megegyeztek a 3.2.1.6. pontban leírtakkal.

3.2.2.3. Az eredmények statisztikai feldolgozása

A kapott motilitás, termékenyülési, valamint kelési eredmények közti különbségeket $p \leq 0,05$ szignifikanciaszint mellett egyszempontos varianciaanalízissel (ANOVA) vizsgáltam, Turkey-Kramer-próbát használva utótesztként. Az adatok normális eloszlását Kolmogorov-Szmirnov-próbával ellenőriztem. Az adatok biometriai feldolgozásához a GraphPad InStat Version 3.01 for Windows statisztikai szoftvercsomagot használtam.

3.3. KÍSÉRLETEK RÓZSÁS DÍSZMÁRNA FAJON

6. ábra. Rózsás díszmárna (*Barbus conchonius*) pár. Fent a tejes, alul az ikrás látható.

3.3.1. Rózsás díszmárna spermamélyhűtése

3.3.1.1. A tejesek fejése

A vizsgálatokhoz használt halakat állatkereskedésekből szereztem be. A halakat (egy vizsgálathoz általában 10 darabot) kivettem az akváriumokból, majd száraz törlőkendővel alaposan megtörölgettem őket, különös tekintettel az ivarnyílásra, hogy nehogy víz érje a spermát, ami azonnali aktivációt eredményezne. Ezek után a hasfal enyhe, de határozott nyomásával egy 0,01 ml-es automata pipetta segítségével fejtem le a hím ivarterméket, ügyelve arra, hogy vizelet vagy bélsár ne szennyezze a mintákat. A pipettába gyűjtött hímivarsejteket 0,2 ml ponty vagy glükóz hígítót tartalmazó Eppendorf-csövekbe helyeztem át (hígítók összetételét lásd később).

Ezt követte a sperma motilitás vizsgálata aktiválatlan és aktivált állapotban. A hígított spermából 0,01 ml-t tárgylemezen vízzel kevertem és fénymikroszkóppal

sötét látótérben 200-szoros nagyítás mellett értékeltem. Csak azokat a spermamintákat használtam fel a további kísérletekben, amelyek motilitása legalább 10 % volt.

A továbbiakban elvégeztem a sperma sűrűségének vizsgálatát vérsejtekhez használt citometriás módszerrel, Bürker-kamra segítségével. A spermát 1000× arányban hígítottam ponty hígítóval, majd a hígított spermából 0,01 ml t fecskendeztem a sejtszámláló kamrába. A spermiumokat 200-szoros nagyításon számoltam meg kamránként 20 négyzetrácsban. Egy négyzetrács területe 0,04 mm^2 (1/25 mm^2), magassága 0,1 mm. A kapott számot átlagoltam (x), majd a következő képlettel számoltam ki a spermiumok számát ml-enként:

$$n\ (\text{spermium/ml}) = x \times 25 \times 10^4 \times 10^3$$

3.3.1.2. A sperma mélyhűtése

A sperma hűtéséhez kétféle hígítót használtam fel. Az első 350 mM glükózt, 30 mM Tris-t (pH 8) tartalmazott. A másik hígító a ponty spermamélyhűtésénél (3.2.2.1. fejezet) ismertetett ponty hígító volt (Magyary és mtsai., 1996).

Védőanyagként 10% DMSO-t és 10% metanolt használtam végső koncentrációban.

A hűtés megkezdése előtt ellenőriztem, hogy mely minták használhatóak fel, melyek azok, amiknek motilitása elfogadható (min. 10 %). Mivel a halakból kinyerhető sperma mennyisége nem haladta meg soha a 0,01 ml-t, ezért a minták további hígítására nem volt szükség. A kísérleti csoport felének ivartermékét ponty hígítóban (n=35), míg másik felének spermáját glükóz hígítóban (n=29) vizsgáltam. A mintákat 0,25 ml-es műszalmákba szívtam fel automata pipetta segítségével. A DMSO védőanyaggal hűtött minták esetében 10 perces equilibrációs idővel dolgoztam, míg metanol védőanyag használatakor a hűtést a védőanyag hozzáadása után azonnal elvégeztem.

A hűtés hungarocell dobozban folyékony nitrogén gőzében történt. A műszalmákat a folyékony nitrogén szintjén úszó 4 cm magas hungarocell kereten helyeztem el, majd 3 perc elteltével a nitrogénbe dobtam a mintákat.

A hűtés után azonnal megkezdtem a minták felolvasztását a felolvasztás utáni motilitás vizsgálata céljából, ami 40ºC-os vízben történt 5 másodpercig. Minden mintánál megvizsgáltam a minták vízzel való aktiválhatóságát és a haladó mozgást végző spermiumok %-os arányát.

3.3.1.3. Az ikrások fejése

A nőstényeket háló segítségével kifogtam az akváriumból, majd ivarnyílásukat szárazra töröltem. A hasi oldalukra óvatosan, de határozott mozdulatokkal kaudális irányban nyomást gyakoroltam és egy petri-csészébe fejtem ki az ikrát. Az ikrák legfeljebb 30 percet állhattak a petri-csészében anélkül, hogy beszáradtak volna. Ezt követte a termékenyítés.

3.3.1.4. A mélyhűtött spermával történő termékenyítés

A nőstényektől nyert ikrát száraz petri-csészékbe osztottam szét, így mintánként 100-150 darab ikraszemet tudtam termékenyíteni. Ezután felolvasztottam annyi, már korábban lefagyasztott spermát tartalmazó műszalmát, ahány ikratételt tartalmazó petri-csésze volt. A felolvasztott hímivarsejteknek vizsgáltam a motilitását, majd hozzáadtam a mintákhoz, majd ehhez 1 ml vizet adtam. A termékenyítés után még 2-3 ml vizet adagoltam az ikrákra és 3-4 percig kevergettem azokat. A termékenyítés után sztereomikroszkóp alatt vizsgáltam a termékenyülést 4 és 8 sejtes állapotban.

Az ikratételek kelésekor meghatároztam a kikelt lárvák arányát a ki nem keltekéhez képest, illetve vizsgáltam a torz lárvák esetleges kialakulását.

3.3.1.5. Az eredmények statisztikai feldolgozása

Az adatok statisztikai feldolgozását InStat Prism 4.0 statisztikai szoftvercsomag segítségével végeztem. A frissen lefejt sperma esetében vizsgáltam, hogy a hígító befolyásolta-e a minták motilitását. Ehhez kétmintás t-próbát végeztem $P<0,05$ szignifikanciaszint mellett. A mélyhűtött minták esetében vizsgáltam, hogy a használt hígítók és védőanyagok gyakoroltak-e hatást a sperma felolvasztás utáni motilitására, amihez kétszempontos variancia-analízist (ANOVA) végeztem, szintén $P<0,05$ szignifikanciaszint mellett.

3.3.2. Comet módszer

Ezzel a vizsgálattal a felolvasztott sperma genomjának roncsolódását detektáltam, így ennek megfelelően az előre lehűtött mintákból olvasztottam fel néhány szalmányit a különböző csoportokból és ezt használtam fel a vizsgálathoz.

3.3.2.1. Tárgylemezek preparálása

A spermát 30 000-szeres arányban hígítottam foszfát pufferrel (PBS, Sigma Aldrich, ref. szám: P-4417). A minták egy részéhez hidrogén-peroxidot adagoltam, mesterségesen roncsolva így a spermiumok genomját. Ezeket a mintákat pozitív kontrollként használtam fel a minták kiértékelésekor. A tömény hidrogén-peroxidot 10 000-szeres hígítást követően 0,5 %-ban adagoltam a hígtott spermamintákhoz.

A tárgylemezek egyik oldalát 0,8 %-os normál agarózzal (Sigma Aldrich, ref. szám: A-6013) vontam be. Miután ez megszilárdult 0,075 ml 1%-os alacsony olvadáspontú agarózt (Sigma Aldrich, A-4018) cseppentettem a lemezekre, melyet előtte azonos mennyiségű mintával (natív vagy felolvasztott sperma+PBS) hígítottam. Fedőlemezt helyeztem a tárgylemezekre és 5 percre egy hűtött fémtálcára fektettem őket, hogy az agaróz megkössön. Miután levettem a fedőlemezeket, rácseppentettem a harmadik réteg gélt, amely 0,09 ml 0,5%-os

alacsony olvadáspontú agaróz PBS-ben feloldva. Ismét fedőlemezzel borítottam be az immár három gélréteget. Hűtött fémtálcára tettem a lemezeket, majd 5 perc elteltével levettem róla és eltávolítottam a fedőlemezt.

A hűtés ideje alatt előkészítettem a lízisoldatot. A következő lépések gyenge vörös fényben, elsötétített laborban folytak. Üvegkádba egymás mellé fektettem a tárgylemezeket és ráöntöttem a lízisoldatot.

Miután a lemezek minimum 1 órán át a lízis oldatban álltak, kivettem és lecsepegtettem a tárgylemezeket. Beletettem őket egymás mellé egy vízszintes elektroforézis kádba, majd óvatosan feltöltöttem a kádat elektroforézis oldattal úgy, hogy a lemezeket tökéletesen elfedje. 40 perc elteltével bekapcsoltam a készüléket, ezalatt a DNS kicsavarodik. A gép bekapcsolásakor a feszültséget 20 voltra, az áramerősséget pedig 300 mA-re állítottam. Az elektroforézis 24 percig tartott. Ezután a lemezeket kivettem a kádból, lecsepegtettem, és egy fémrácsra helyezem azokat, hogy semlegesítő oldattal öntsem le a felszínüket kétszer, ötperces időközzel.

A lecsepegtetett lemezekre 0,05 ml ethidium bromidos (Sigma Aldrich, ref. szám: 8751) oldatot pipettáztam, és fedőlemezzel lefedtem. Mikroszkóp alatt fluoreszcens fényben vizsgáltam a keletkezett képet. A fotókat Nikon Eclipse E600 típusú mikroszkópra szerelt Nikon Coolpix 4500 digitális fényképezőgéppel készítettem.

3.3.2.2. Oldatok összeállítása

A. Foszfát puffer

Ca és Mg mentes PBS tabletta, a csomagoláson található előírás szerint feloldva.

B. Lízis oldat

Hozzávalók 1 literre:

NaCl	146,2 g

EDTA	37,2 g (Sigma Aldrich, ref. szám: ED2SS
Tris	1,2 g (Sigma Aldrich, ref. szám: T-6791)

A vegyszereket kimértem, hozzáadtam kb. 800 ml desztillált vizet, beállítottam a pH-értéket, majd feltöltöttem 1 literre. A pH-t 10-re kell beállítani szemcsés nátrium-hidroxid folyamatos adagolásával.

Használat előtt 1,5 ml Triton X-100-at (Sigma Aldrich, ref. szám: T-9284) és 15 ml DMSO-t tettem 135 ml lízis oldathoz.

C. Elektroforézis puffer

NaOH	200 g/liter (5N)
EDTA	74.4 g/liter

2000 ml desztillált vízbe belemértem 120 ml-t az 5 normálos NaOH oldatból és 10 ml-t az EDTA oldatból.

D. Semlegesítő puffer

Tris	48.5 g/liter

A pH-t 7.5-re kell beállítani tömény HCl-al.

E. Festő oldat

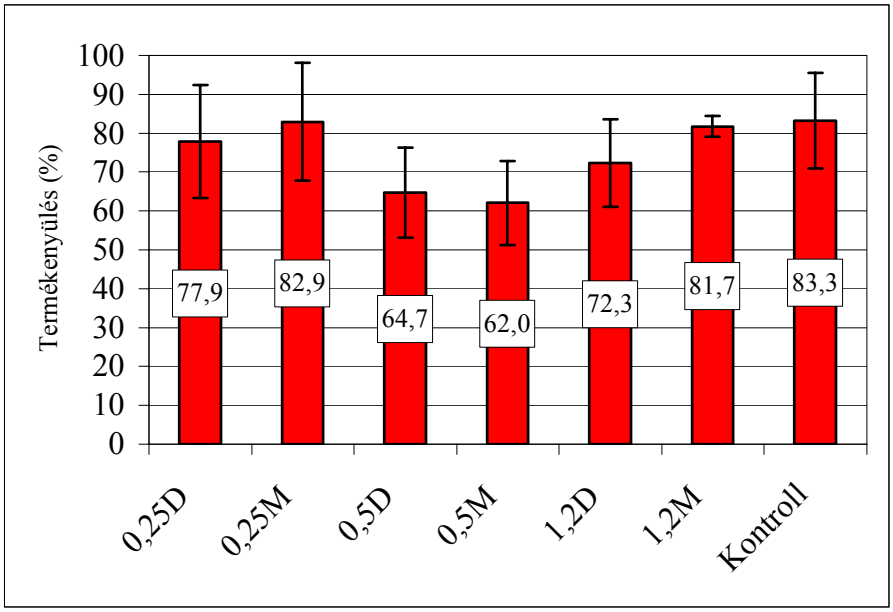
Ethidium bromid	10 mg/50 ml desztillált víz

Használat előtt 1:9 arányban kell hígítani PBS-sel (0,9 ml PBS-hez 0,1 ml ethidium bromid törzsoldat).

4. EREDMÉNYEK

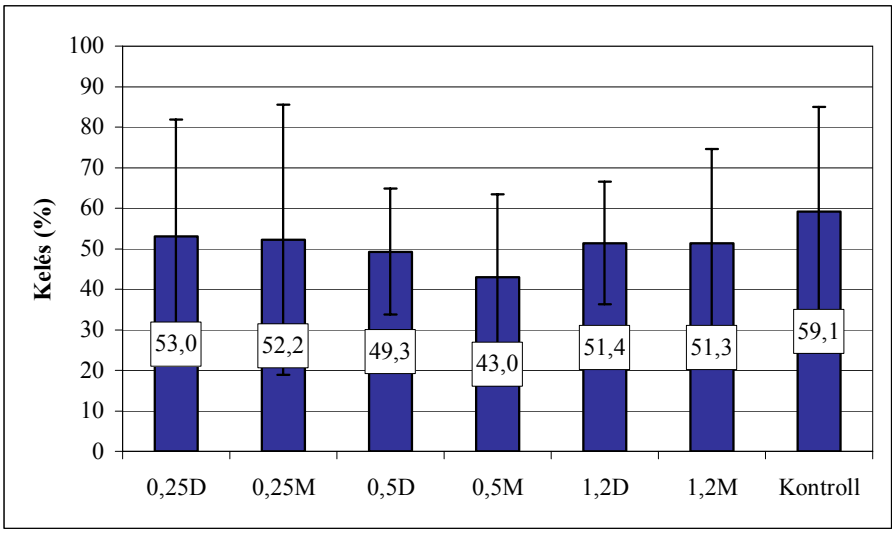
4.1. AFRIKAI HARCSA FAJON VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

A mélyhűtött spermával termékenyített ikratételek termékenyülése 62 és 83% között váltakozott, 83%-os kontroll termékenyülés mellett (7. ábra). A termékenyülés szempontjából nem mutatkozott statisztikailag szignifikáns különbség az egyes kezelések között sem a használt védőanyagok, sem az alkalmazott műszalmák méretei tekintetében.



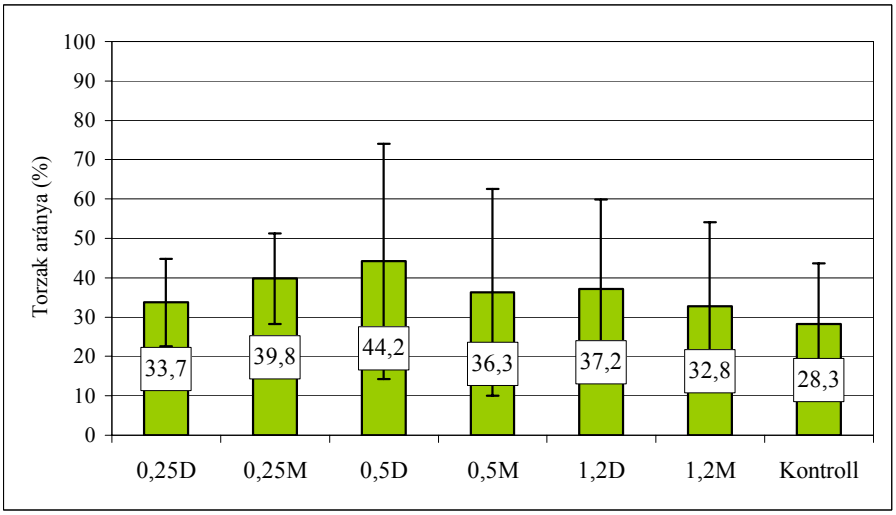
7. ábra. Afrikai harcsa mélyhűtött spermájával elért termékenyülési eredmények (n=5). Jelölések: 0,25; 0,5; 1,2-műszalma mérete ml-ben, M-metanol, D-DMSO

A kelési eredmények 43 és 53 % között változtak, 59%-os kontroll kelés mellett (8. ábra). A kezelések között ebben az esetben sem volt jelentős különbség.



8. ábra. Afrikai harcsa kelési eredményei mélyhűtött sperma alkalmazását követően

A torz lárvák aránya az összes kikelt lárvához képest 33 és 44% között alakult (9. ábra). A kontroll csoportban a torz lárvák aránya 28% volt. Az egyes kezelések között itt sem találtam statisztikailag értékelhető különbséget.



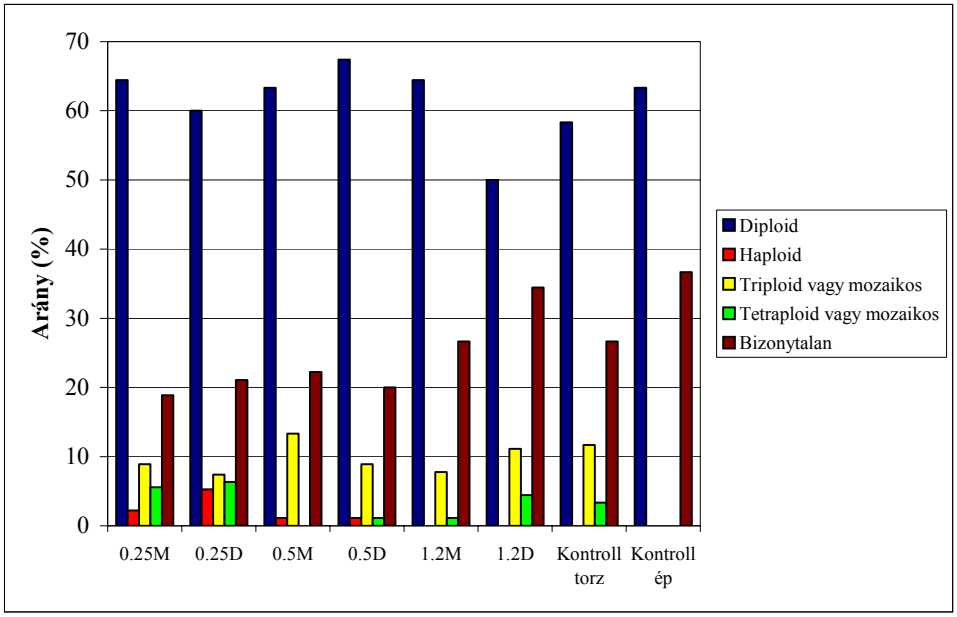
9. ábra. A torz lárvák aránya az összes kikelt lárva százalékában.

Attól függően, hogy a minták kromoszómaszáma több, vagy kevesebb, mint 84, megállapítottam triploidok, illetve tetraploidok jelenlétét. Fontosnak tartom megjegyezni, hogy ezek az egyedek lehettek mozaikosak is, tehát olyan példányok,

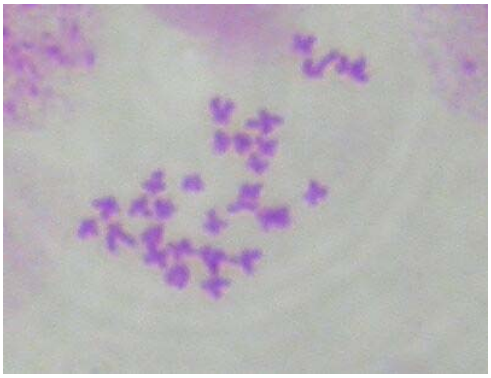
amelyek egyszerre tartalmaznak diploid és triploid, illetve tetraploid kromoszómagarnitúrájú sejteket is.

A „Bizonytalan” csoportba soroltam a rosszul festődött vagy osztódást nem tartalmazó preparátumokat.

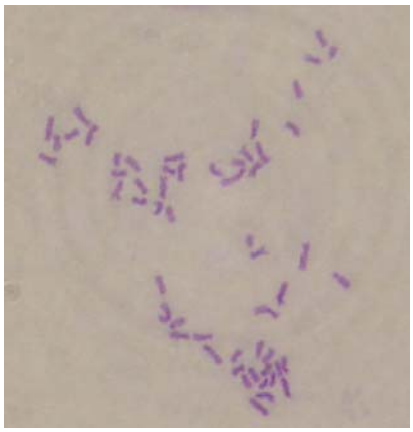
A torz lárvák kromoszómaszámának alakulását mutatja be a 10. ábra. Eddig 755 db lárva preparátumát vizsgáltam át. Haploid lárvát (28 db kromoszóma) négy kezelésben találtam, a 0,25 illetve a 0,5 ml űrtartalmú műszalmák használata esetén.



10. ábra. A különböző kromoszómaszámú minták megoszlása a vizsgált kezelésekben.

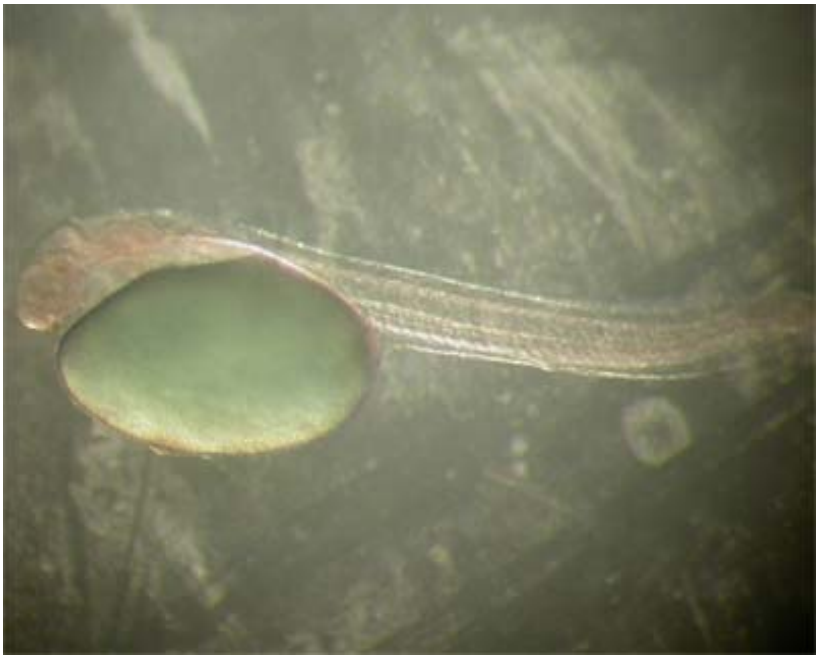


a.



b.

11. ábra. Afrikai harcsa haploid (a. n=28) és diploid (b. n=56) metafázisa.



12. ábra Afrikai harcsa ép lárvája

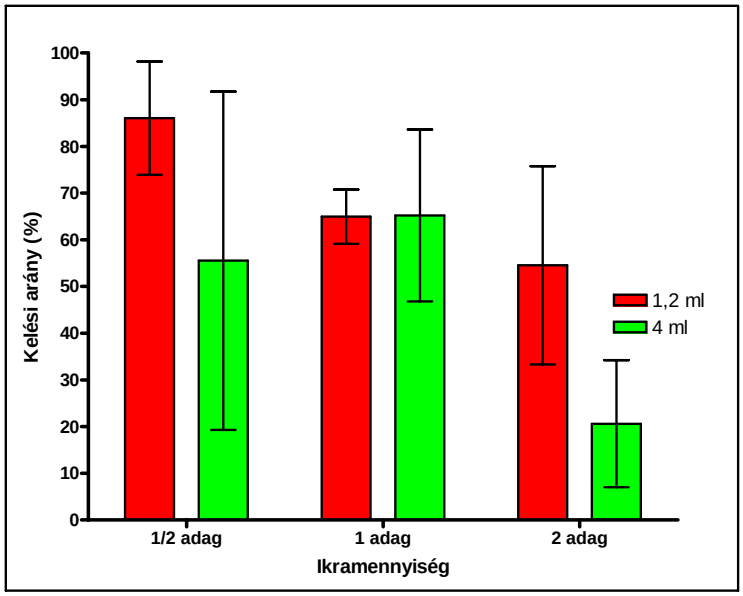
13. ábra Afrikai harcsa torz lárvája

4.2. PONTY FAJON VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

4.2.1. Nagyméretű műszalmák használatának eredményei

A mélyhűtött spermával termékenyített ikratételek kelése 20 és 86% között váltakozott, 82%-os kontroll termékenyülés mellett. A legmagasabb kelési eredményeket (14. ábra) 1,2 ml-es szalmák használata mellett a 0,5 ml-es szalmákra optimalizált 0,5 ml felolvasztott sperma/10g ikra arányhoz képest fél adag ikra használata mellett (86±12%) kaptam, míg 4 ml-es szalmák használatakor egész adag ikra termékenyítése adta a legjobb eredményt (65±18%).

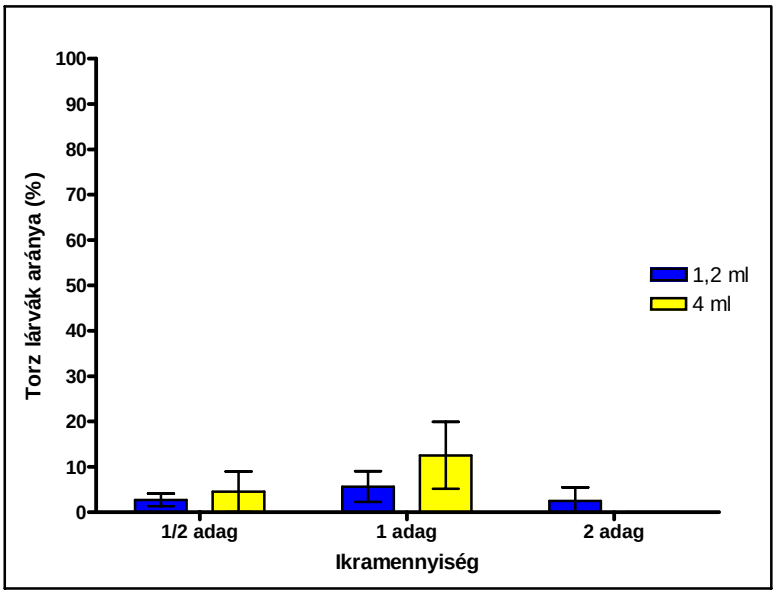
Általánosságban elmondható, hogy mind a használt műszalmák mérete (p=0,0186), mind az ikra mennyisége (p=0,0093) statisztikailag szignifikáns hatást gyakorolt a kelési eredményekre.



14. ábra. Mélyhűtött pontyspermával kapott kelési eredmények (átlag±szórás, n=4).

A különböző ikramennyiségeket összehasonlítva változó mennyiségű torz lárva kelését tapasztaltam (15. ábra). Meglepő módon a kontroll csoportban találtam

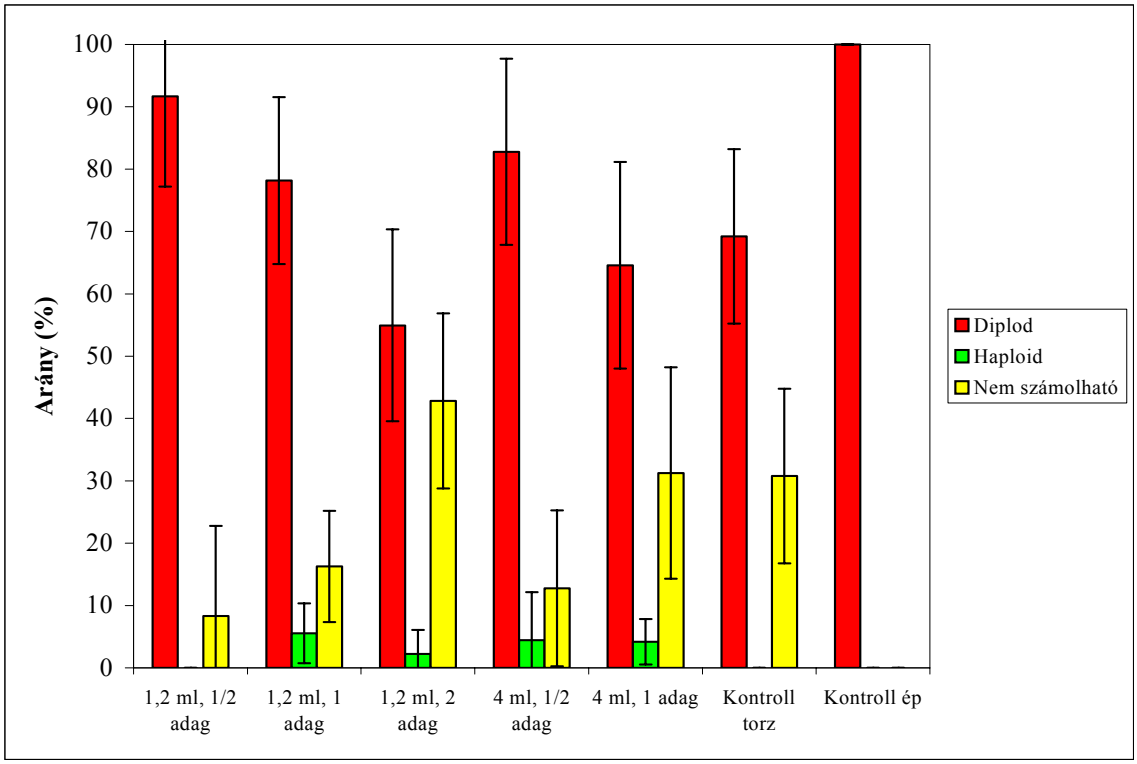
a legtöbb torz lárvát (15±9%). A mélyhűtött spermával termékenyített csoportok közül 4 ml-es műszalmák használatakor és egész adag ikra termékenyítésekor kaptam a legtöbb torz lárvát (13±7%). Egyedül a 4 ml-es szalma és dupla adag ikra kombinációjánál nem találtam torz kelésű lárvát, azonban ennél a csoportnál a kelési eredmények eleve gyengék voltak.



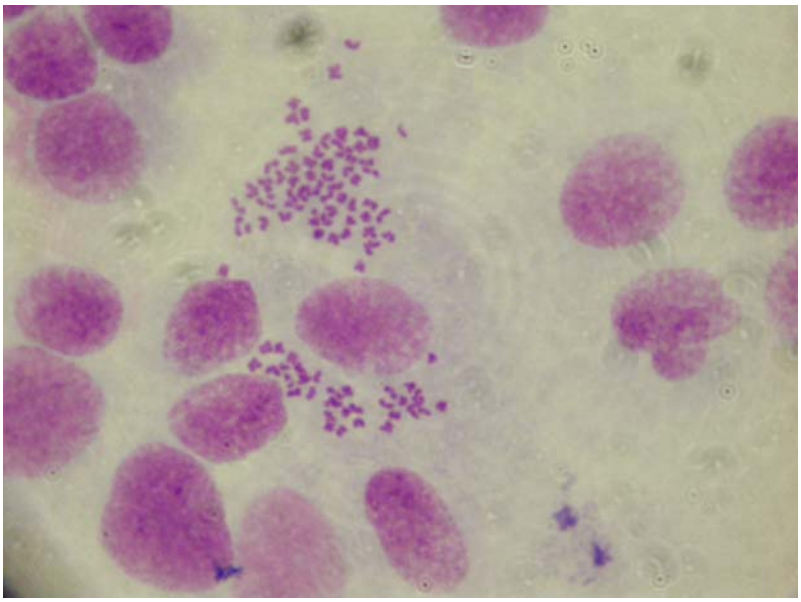
15. ábra. Torz lárvák aránya az összes kikelt lárvához képest (átlag±szórás, n=4).

A felhasznált ikra mennyisége szignifikáns hatást gyakorolt a torzak arányára (P=0,0032) a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kelt lárvák esetében azonban a felhasznált szalma mérete nem volt szignifikáns hatással rá.

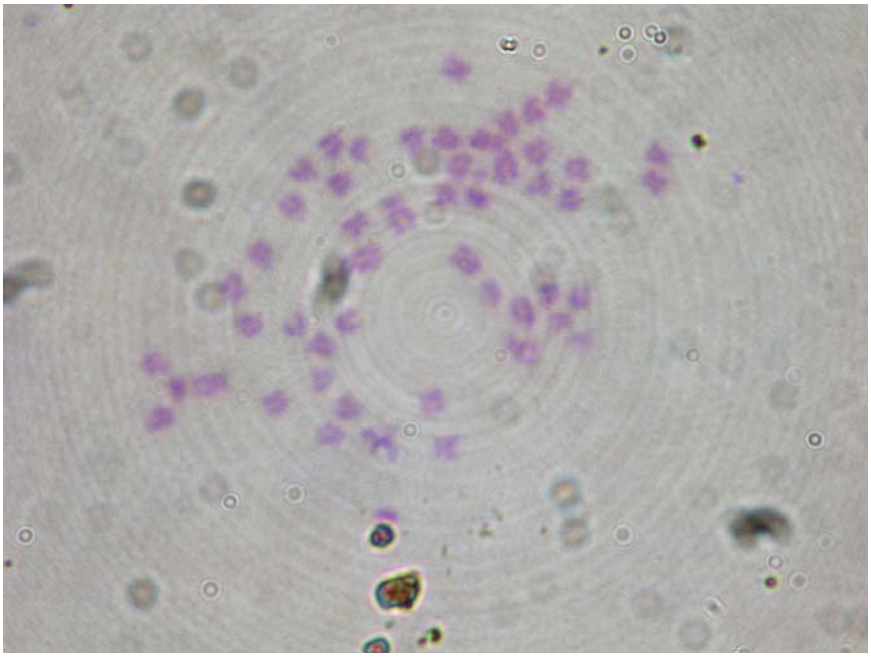
Végül vizsgáltam a torz fejlődésű lárvák kromoszómaszámának alakulását és összesen több mint 260 lárvát dolgoztam fel (16. ábra).



16. ábra. A mélyhűtött pontyspermával termékenyített ikrából kikelt torz fejlődésű lárvák kromoszómakészletének alakulása (átlag±szórás, n=3). A friss spermával termékenyített kontroll csoportban mind a torz, mind az ép lárvák kromoszómaszámát vizsgáltam.



17. ábra Ponty diploid metafázisa

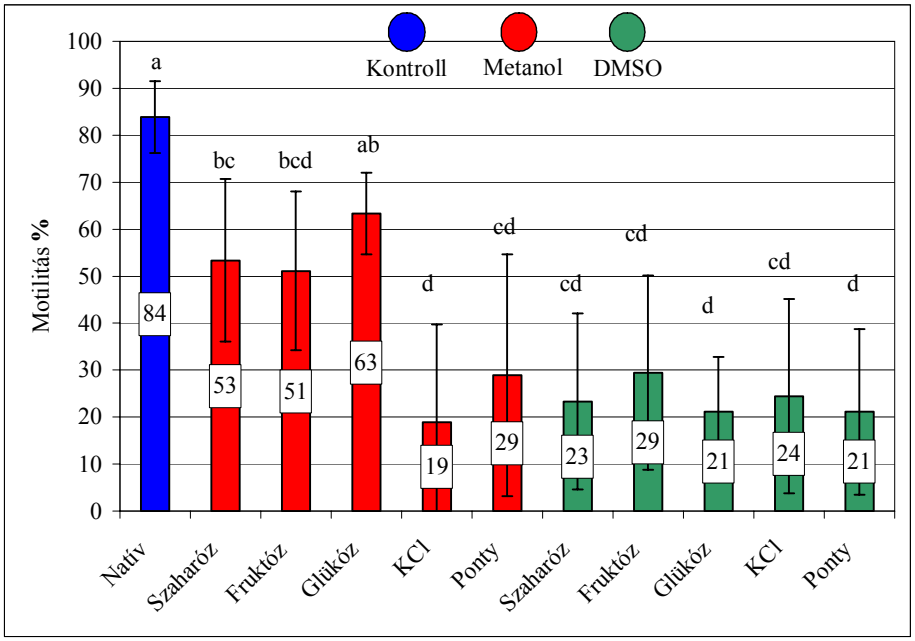


18. ábra Ponty haploid metafázisa

4.2.2. Különböző hígítók alkalmazásának eredményei

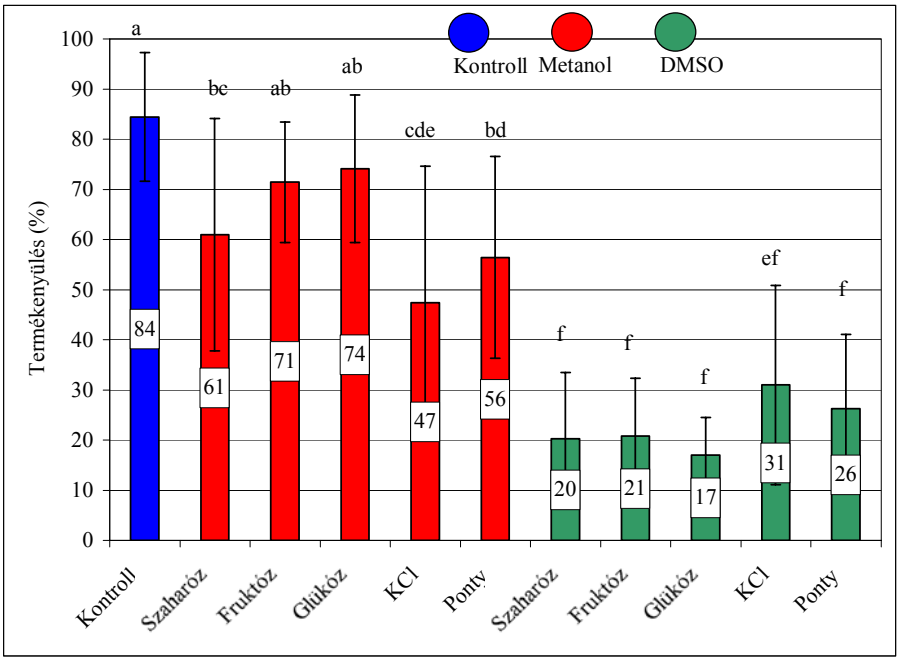
A tejes egyedek oltását követően minden alkalommal mind az öt egyed megfelelő mennyiségű (5-15 ml) spermát adott. Az ikrások úgyszintén kivétel nélkül reagáltak a hormonális indukcióra.

A friss sperma motilitása a kontrollnál 84±7% volt n=15 ismétlésszámnál. A legmagasabb felolvasztás utáni motilitást (63±9% n=9) a glükóz hígító és a metanol mint védőanyag adta (19. ábra). Statisztikailag nem volt kimutatható különbség a kontroll és a metanol-glükóz kombinációja között. A többi hígító alkalmazása metanollal nem adott ilyen magas motilitási értéket. Azonban elmondható, hogy a metanolos minták általában jobbnak bizonyultak, mint amikor DMSO-t használtam védőanyagként.



19. ábra. A mélyhűtött pontysperma felolvasztás utáni motilitás eredményei különböző hígító és védőanyag kombinációk alkalmazásánál. Az oszlopok feletti azonos betűk statisztikailag szignifikánsan nem különböző csoportokat jelölnek (n=9, kontroll: n=15).

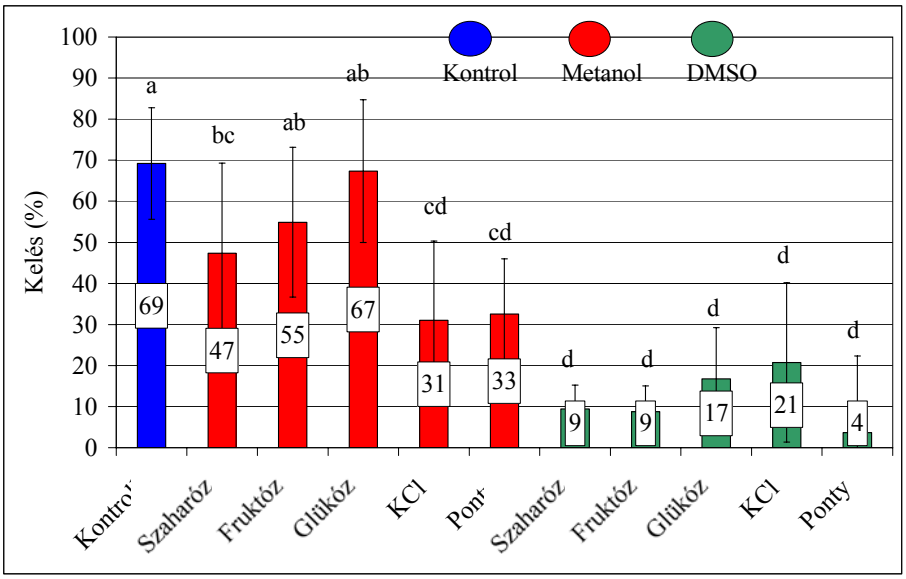
A legjobb termékenyülést 4-8 sejtes állapotban, 74±15%-ot (kontroll értéke 84±13%) n=12 ismétlés számnál a metanol védőanyag és glükóz hígító adta (20. ábra). Statisztikailag szignifikáns különbséget nem találtam a kontroll és a fruktózos és glükózos minták között metanol védőanyag használata mellett. Azonban az kijelenthető, hogy amikor metanolt használtam védőanyagként mindig jobb eredményeket kaptam, mint a DMSO alkalmazása esetén.



20. ábra. Mélyhűtött pontyspermával kapott termékenyülési eredmények különböző hígító és védőanyag kombinációk alkalmazásával. Az oszlopok feletti azonos betűk statisztikailag szignifikánsan nem különböző csoportokat jelölnek (n=12).

A legjobb kelési eredményt (67±17%, n=9) ismét a glükóz, mint hígító és metanol, mint védőanyag kombinációjánál kaptam (21. ábra). Itt a kontroll eredménye 69±14% volt. Az eredmények statisztikai feldolgozását követően hasonló megállapítást tehettem, mint a termékenyítési eredmények esetében. Itt sem volt statisztikailag szignifikáns különbség a kontroll, és a fruktóz-metanol, glükóz-metanol kombinációk között. A metanolos mintákkal kapott eredmények ebben az esetben is felülmúlják DMSO használata során kapottakat.

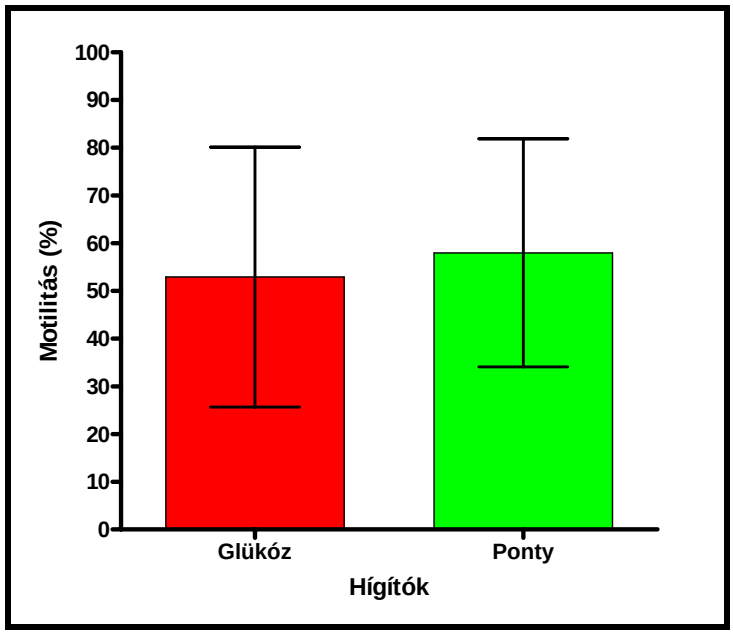
A kikelt lárvák között nem találtam torz fejlődésű egyedeket.



21. ábra. Mélyhűtött pontyspermával kapott kelési eredmények különböző hígító és védőanyag kombinációk alkalmazása mellett. Az oszlopok feletti azonos betűk statisztikailag szignifikánsan nem különböző csoportokat jelölnek (n=9).

4.3. RÓZSÁS DÍSZMÁRNA FAJON VÉGZETT VIZSGÁLATOK EREDMÉNYEI

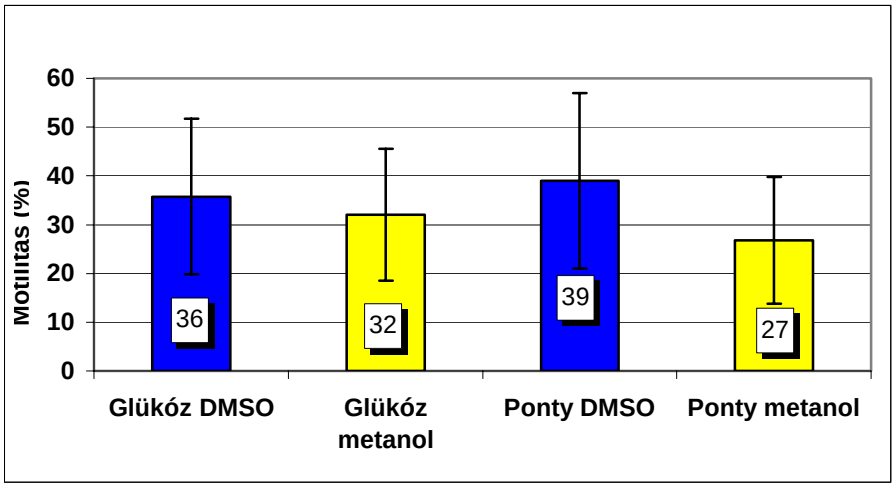
A tejesek fejésekor nyert sperma mennyisége elegendő volt, átlagosan 0,01 ml-t sikerült az egyedektől kinyernem. A sperma sűrűsége 1,928 ± 0,223 × 10^{10} db/ml volt (n=9). A lefejt spermát két különböző hígítóval hígítottam, glükóz és ponty hígítóval. Az egyes hígítókra nézve a frissen fejt hímivarsejtek motilitása nem mutatott szignifikáns különbséget, a glükóz hígítóban a friss sperma motilitása 53±27 % volt, míg a ponty hígítóban 58±24 % értéket kaptam (22. ábra)



22. ábra. Frissen fejt rózsás díszmárna sperma motilitása két különböző (glükóz és ponty) hígítóban végzett hígítás után (glükóz hígító: n=35, ponty hígító: n=29).

A sperma felolvasztása után végzett vizsgálatoknál nem tapasztaltam jelentős ingadozást a kiindulási és a felolvasztás utáni motilitás értékek között. Akadtak ugyan olyan minták, melyek kiindulási motilitása nem haladta meg a 20%-ot, ám ezt az értéket megőrizték a fagyasztás során is és így a felolvasztás után ugyanolyan motilitási értéket kaptam, mint a kiindulásnál.

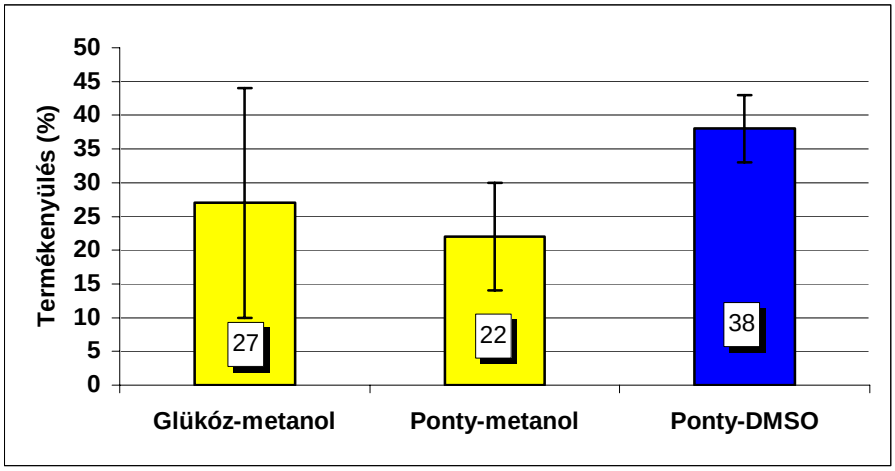
A felolvasztás utáni motilitás vizsgálatoknál azt tapasztaltam, hogy a ponty hígítóval kezelt minta esetén volt a legmagasabb a hímivarsejtek motilitási értéke. Ha az egyes hígítókat hasonlítottam össze a hozzájuk adott védőanyagok függvényében, azt tapasztaltam, hogy a felolvasztás utáni maximális motilitást (39±18 %, n=26) a ponty hígító és a DMSO, mint védőanyag adta (23. ábra). A leggyengébb motilitást ponty hígító és metanol védőanyag esetén kaptam (27±13%, n=30). A glükóz hígítóval kezelt minták kiegyenlítettebbnek nevezhetők: glükóz hígító és DMSO védőanyag esetén 36±16% motilitást tapasztaltam, n=26 mintaszám mellett, míg glükóz hígító és metanol védőanyag alkalmazásakor a motilitási érték 32±14% lett, n=30 mintaszám mellett. Statisztikailag szignifikáns különbség, $p<0,05$ szignifikancia szintnél nem volt kimutatható egyik hígító alkalmazásakor sem a két védőanyag függvényében.



23. ábra. Mélyhűtött rózsás díszmárna spermával kapott felolvasztás utáni motilitás eredmények. A hűtéshez kétféle hígítót (glükóz és ponty hígító) és kétféle védőanyagot (DMSO és metanol) használtam.

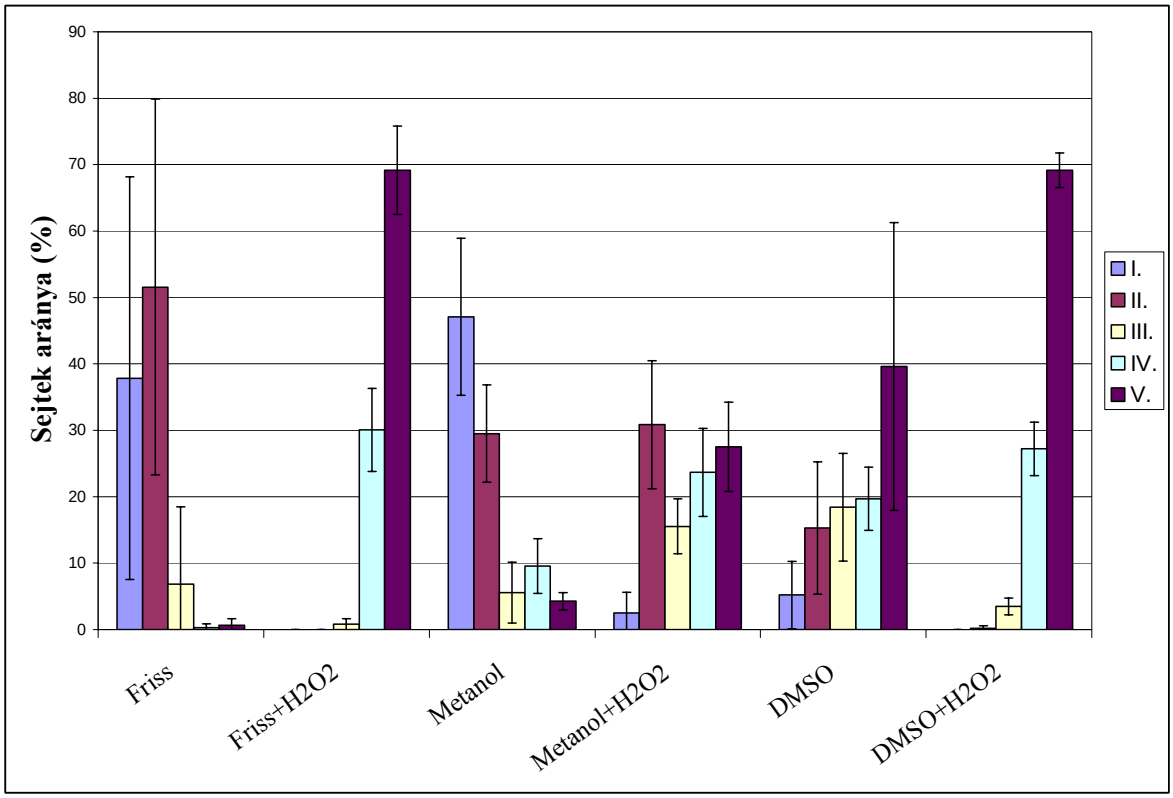
A legjobb termékenyülési érték, amit mélyhűtött sperma felolvasztása után, 4-8 sejtes állapotban vizsgálva, ponty hígító és DMSO védőanyag mellett kaptam 38±5% lett, n=3 ismétlésnél 79%-os kontroll termékenyüléssel szemben (24. ábra).

A legjobb kelési eredmény 10±7% lett (n=3), míg a kontroll csoport 77%-a kelt ki.



24. ábra: Mélyhűtött rózsás díszmárna spermával kapott termékenyülési eredmények. Ponty-glükóz kombinációval végzett vizsgálatok nem adtak feldolgozható eredményeket.

A comet módszer alkalmazásával a friss sperma vizsgálatakor nem észleltem V. fokozatú, azaz maximálisan roncsolt sejteket a kezeletlen csoportban, míg a hidrogén-peroxiddal roncsolt csoportban szinte csak IV. és V. fokozatú sejteket találtam. A metanol védőanyag használata mellett a teljesen ép, I. kategóriájú sejtek magas arányban fordultak elő (47%), azonban DMSO alkalmazásánál csak 5,2%-ban találtam ilyen sejteket. Hidrogén peroxidos kezelést követően metanol használata mellett 27,5% volt a maximális károsodást mutató sejtek aránya, míg DMSO használatát követően ez az arány többszörös volt (69,2%) (25. ábra).



25. ábra Rózsás díszmárna friss és különböző védőanyagokkal (metanol és DMSO) hűtött, majd felolvasztott spermájának vizsgálata kezeletlen és hidrogén-peroxiddal (H_2O_2) kezelt csoportokban. A függőleges tengelyen a különböző állapotú sejtek százalékos aránya olvasható le.

5. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

5.1. AFRIKAI HARCSA FAJON KAPOTT EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

A fagyasztott spermával való termékenyítés hatásainak hátterét eddig még csak kevesen vizsgálták. Kiindulási pontom az volt, hogy a korábbi kísérletek nagyobb arányú torz lárva jelenlétét mutatták mélyhűtött sperma alkalmazását követően. Ennek magyarázatát az eredményeink kiértékelése során kíséreltem megkeresni.

755 db lárva-preparátum alapján, eltekintve a rosszul festődött, illetve a nem osztódott egyedek preparátumaitól, az alábbi következtetésekre jutottam:

Saját kísérleteim alapján megállapítottam, hogy a termékenyülés szempontjából nem mutatható ki szignifikáns különbség az egyes kezelések között, sem a használt védőanyagok, illetve hígítók, sem az alkalmazott műszalmák méretei tekintetében. A termékenyülés a kontroll csoportban 83%, a többi csoportban 62 és 83% között változott.

A kelési százalék 43 és 53% közötti értékeket vett fel, a kontroll esetében 59% volt, tehát ebben az esetben sem volt értékelhető különbség a kezelések között.

Mivel a kelési eredmény a kontroll csoportban ilyen alacsony volt, arra következtettem, hogy az általam használt ikra igen gyenge minőségű, hiszen általában a termékenyülés eléri a 90%-ot és a kelés is 70% körül alakul, még laboratóriumi körülmények között is.

A torz lárvák aránya az összes kikelt lárvához képest 33 és 44% között alakult. A 28% torz lárva a kontroll csoportban nem támasztja alá azt a korábbi feltevést, hogy a kezelt csoportban a torz lárvák aránya magasabb, bár ez is visszavezethető a gyenge minőségű ikrára.

A 755 db eddig megvizsgált lárva preparátum legnagyobb része diploid (2n=56) volt, tehát a torz lárvák többsége normális kromoszómaszerelvénnyel rendelkezik.

Egyértelműen megállapítható haploid lárvát (28 kromoszóma) négy kezelésben találtam: a 0,25 ml és a 0,5ml méretű szalmákkal végzett termékenyítések esetén. Ezek valóban létrejöhettek sérült genommal rendelkező spermium által termékenyített ikrából, tehát a spermium élettani funkcióját betöltötte, behatolt a mikropylen keresztül, elindította a barázdálódást, de a pronukleuszok egyesülése nem ment végbe, a spermium maganyaga már nem vett részt a létrejövő embrió genomjának kialakulásában. Ennek két magyarázata lehetséges: 1. az intracelluláris jég ugyanúgy darabokra roncsolja a kromoszómákat, ahogyan a genommanipulációs kísérleteknél az UV sugárzás (Nace és mtsai., 1970), a röntgensugárzás (Stanley és Sneed, 1973), vagy a gammasugárzással való kezelés teszi (Purdom, 1969; Stanley és Sneed, 1973; Cherfas, 1971; Nagy és mtsai., 1978). Ezt könnyítheti az a tényező is, hogy a halak spermiumában a kromatin messze nem olyan tömör szerkezetű, mint a fejlettebb gerincesekében, nem jellemző rájuk a később megjelenő lamelláris szerkezet (Bacetti és Afzelius, 1976). 2. A fagyasztás és felolvasztás során sérült és elhalt sejtekből nagymennyiségű, igen reaktív oxidatív vegyület szabadul fel, amelyek súlyosan roncsolják az egyébként ép sejtek DNS-ét (Labbe és mtsai., 2001).

Feltételezésemet az is alátámasztja, hogy haploid egyedeket csak a mélyhűtött spermával kezelt csoportokban találtam, a kontroll csoportok ép és torz egyedei között nem.

Korábban a nem pontosan meghatározható kromoszómagarnitúrával rendelkező lárvákat aneuploidoknak minősítettem, később ezeket átminősítettem, mivel aneuploidok képződése igen ritka.

Triploid, illetve tetraploid egyedek jelenlétét állapítottam meg, attól függően, hogy kromoszómaszámuk 84 alatt vagy fölött volt. Egyértelműen tetraploidokat, tehát 112 vagy ahhoz nagyon közeli kromoszómaszámú egyedeket is találtam. Megjegyezném, hogy ezek az egyedek lehetnek mozaikosak is, így tartalmaznak diploid és triplod, illetve tetraploid kromoszómaszerelvénnyel rendelkező sejteket is.

Kísérletileg Chourrout (1982) pisztrángnál, Myers (1986, cit. Várkonyi, 1997) pedig egyes tilápia fajoknál írta le, hogy az abnormális embriók és lárvák

között jóval nagyobb arányban fordultak elő tetraploidok, mint a fenotípusosan normális megjelenésűek között. Markert (1982, cit. Várkonyi, 1997) szerint az endomitózissal keletkezett tetraploidok rossz életképessége identikus kromoszómapárjaik abnormálisan szoros topográfiai interakciójának (négy kromoszóma közötti komplex interakció) is betudható. A kromoszómapárok ilyen szoros interakciója késleltetheti, vagy gátolhatja a normális génexpressziót. Ezt mutatják a mi eredményeink is az afrikai harcsánál, hiszen a kontroll ép csoportban egyáltalán nem találtam tetraploidokat.

Találtam ezen kívül a 0,25 M csoportban egy haploid-diploid mozaikos egyedet is (a grafikonon a diploidok közé soroltam). Az ilyen egyedek felbukkanását is említi a szakirodalom, pl. a Salvelinus nemzetségben (Yamaki és mtsai., 1999). Ezek keletkezését nehezebb egyértelműen meghatározni. Mindenképpen ki kell hangsúlyoznom, hogy ilyen egyedeket a kontroll csoport torz egyedei között is találtam, tehát a haploidokkal ellentétben, keletkezésük nem a mélyhűtés következménye.

A kontroll csoport ép lárváinak preparátumai közül mindegyik egyértelműen meghatározható diploid volt, illetve előfordult, hogy a preparátumban nem találtam számolható osztódást.

A triploid és tetraploid egyedek létrejöttének oka lehet polispermia, melyet pontynál már megfigyeltek, afrikai harcsánál azonban még nem írták le.

Yamazaki és munkatársai (1982, cit. Várkonyi, 1997) lazacnál vizsgálták az ondósejtek öregedésének hatását az abnormálisan fejlődött embriók arányára. 5-28 nappal a spermiáció bekövetkezése után termékenyítettek és nem találtak változást az abnormális embriók számának emelkedésében. Ez arra utal, hogy az abnormális embriók számának emelkedésében a női gaméták túlérése az elsődleges.

Rendellenes fejlődésű lárvák keletkezhetnek az ikra öregedéséből adódóan is, ezért mi a kísérleteink során törekedtünk az ivartermék minél hamarabbi (fél órán belüli) felhasználására. Linhart és Billard (1995, cit. Várkonyi, 1997) úgy találta, hogy harcsánál 6 órával az ovuláció után van az az időpont, amikor az abnormális lárvák aránya hirtelen 50% fölé emelkedik.

Tegyük fel, hogy a hűtőmédiumok toxikus hatásának is köszönhetően nő meg a rendellenes fejlődések aránya. Ebben az esetben viszont a kontroll csoportban alacsonyabb százalékban kellett volna szerepelnie abnormális embriónak. A toxikus hatású hűtőmédiumok nagyon kis mennyiségben érintkeznek az ikrával és koncentrációjuk a vízzel való aktiválás után elhanyagolható.

A nagy arányú torz lárva keletkezésében, amelyek mind a kontroll, mind pedig a kezelt csoportban szerepelnek, minden valószínűség szerint az eddig felhasznált ikrások gyenge minőségű ivarterméke, illetve a már említett keltetőházi hiányosságok játszanak közre.

Egyes környezeti tényezők, úgymint az alacsony oldott oxigén szint, a keltetővíz áramlási sebessége vagy egyes szintetikus hormonok szintén okozhatnak torz fejlődést lárváknál (Várkonyi, 1997). A sejtosztódás a 2 hatványai szerint folyik, egészen a szedercsíra (morula) állapotig. A morula állapotban a sejtkapcsolatok lazák, a sejtek ezért könnyen elmozdulnak, ami a későbbiekben torz lárvafejlődéshez vezet (H. Tamás és mtsai., 1982).

A rendellenes fejlődés oka tehát a lárvák többségénél nagyrészt nem genetikai eredetű és nem a mélyhűtésre vezethető vissza. Bár a fenotípusos rendellenességet mutató lárvák száma lényegesen meghaladta a kromoszómálisan rendellenesekét, ezzel együtt szoros összefüggés mutatható ki a morfológiai és a citogenetikai rendellenességek között, hiszen az általam megvizsgált abnormális kromoszómagarnitúrával rendelkező összes egyed fenotípusosan is torz volt.

5.2. PONTY FAJON KAPOTT EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

5.2.1. Nagyméretű műszalmák használatánál kapott eredmények értékelése

A nagyméretű műszalmák használatának vizsgálata alapján megállapítható, hogy a kelés szempontjából statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott az ikra mennyisége valamint a szalmaméret között. A torzak aránya a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kelt lárvák esetében szignifikáns különbséget

mutatott az ikra mennyiségére nézve. A torzak aránya a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kelt lárvák esetében nem mutatott szignifikáns különbséget a sperma mennyiségére nézve.

Mivel a kelési eredmény a kontroll csoportban igen jónak mondható, az általunk használt ikra megfelelő minőségű, így a torz fejlődés okát nem az ikra minőségében kell keresni.

A torz lárvák aránya az összes kikelt lárvához képest 0 és 15% között alakult. A 15% torz lárva a kontroll csoportban nem támasztja alá azt a korábbi feltevést, hogy a kezelt csoportban a torz lárvák aránya magasabb.

A 260 db eddig megvizsgált lárva preparátum legnagyobb része diploid (102±2 kromoszóma) volt, tehát a torz lárvák többsége normális kromoszómaszerelvénnyel rendelkezik.

Egyértelműen megállapítható haploid lárvát (51 kromoszóma) 4 kezelésben találtam, 1,2 ml-es műszalma esetén a 20 és 30 grammos tételekben, míg a 4 ml-es szalma használatánál a 40 és 80 grammos adagban végzett termékenyítések esetén.

5.2.2. Különböző hígító alkalmazásakor kapott eredmények értékelése

A hordozható mélyhűtéses módszer optimalizálására végzett kísérletek során megállapítottam, hogy motilitási értékek alapján nem határozható meg megfelelő hígító, védőanyag, illetve hígítási arány, mivel egyik kombináció sem adott egyértelmű eltérést.

A termékenyülési eredmények alapján kijelenthető, hogy a metanol védőanyag mind az öt hígítóval jó eredményt adott. Glükóz esetében tapasztaltam a legmagasabb, 74%-os termékenyítési értéket, míg a leggyengébbet, 47%-os értéket a KCl esetében kaptam.

A DMSO védőanyag esetében a KCl hígító használatakor volt a legmagasabb, 31% a termékenyülés. Ezzel ellentétben a metanol esetén ez a hígító bizonyult a legkevésbé eredményesnek.

A korábbi publikációkból kiderül, hogy az eddigi kutatások során igen sok szerző (Kurokura és mtsai, 1984; Moczarski, 1977; Koldras és Bieniarz, 1987) nagy

jelentőséget tulajdonított a DMSO-nak. Más halfajoknál, harcsa és pisztrángféléknél elért sikeres eredmények (Lahnsteiner és mtsai, 1997; Steyn és Van Vuren, 1987) alapján alkalmaztam a metanolt, mint védőanyagot és kísérleteim eredményesnek bizonyultak. A metanollal végzett kísérletek eredményei nemcsak jobbak, de kiegyenlítettebbek is, mint a DMSO-val kapott eredmények.

Hígítási arányként az 1:9 hígítási arány bizonyult a legjobbnak. A szakirodalom alapján alkalmaztak 1:1 illetve 1:6 -os hígítási arányt (Moczarski, 1977). Lahnsteiner és mtsai (2000) szerint a pontysperma hatékony mélyhűtéséhez elengedhetetlen a legalább 1:5 arányú hígítás.

Metanol esetében a hígítás után azonnal megkezdtem a hűtést, míg a DMSO esetén 10 perces equilibrációval számoltam és csak ezután történt a sperma hűtése. Más szerző is alkalmazott equilibrációt, Moczarski (1977) esetében 6 másodperctől 5-6 percig tartott, míg Sneed és Clemens (1956) is említést tesz az equilibrációról, bár pontos adatokkal nem szolgálnak.

Hűtés után azonnal kiolvasztottam a mintákat 40ºC-os vízfürdőben 13 másodperc alatt. Lubzens és mtsai (1993) 25ºC-on 2-3 perc alatt olvasztották fel a műszalmák tartalmát.

A cukoralapú hígítók esetében azt tapasztaltam, hogy felolvasztás után a sperma zselés, gélszerű állapotot vett fel, függetlenül az alkalmazott védőanyagtól. Ezt a jelenséget nem tapasztaltam a só alapú hígítóknál. Más szerzők publikációiban erre utalást nem találtam, konzultációk során (Lahsteiner, személyes közlés, 2002) jutottunk ahhoz az információhoz, mely szerint mások is találkoztak ezzel a jelenséggel. Eredményeim szerint ez az agglutináció nem befolyásolja a termékenyülési, illetve kelési eredményeket.

Motilitás vizsgálatot követően a megfelelőnek talált mintákkal termékenyítettem, majd a termékenyülést 4, 8 sejtes állapotban és keléskor vizsgáltam. Minden esetben végigkövettem az esetleges lárvakori torzulásokat.

A termékenyítés során 1 műszalmányi spermát 10g (kb 8000-9000 db) ikrához kevertem, míg Kurokura és mtsai (1984) 1 ml-1 g, illetve 1 ml-50g kombinációt alkalmazott.

Az általam használt kombinációk közelebb állnak a gyakorlati alkalmazáshoz, mivel 1 műszalmával (0,5 ml 10-szeres hígítással) 10g ikrát tudtam termékenyíteni, ami már félüzemi szinten eredményesen felhasználható. Eredményeim megbízhatóságát nagymértékben alátámasztja a magas ismétlésszám.

5.3. RÓZSÁS DÍSZMÁRNA FAJON KAPOTT EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE

Az akváriumi halak közé tartozó – és fontos laborállatnak is számító – rózsás díszmárna spermájának mélyhűtésével eddig egyetlen kutató sem foglalkozott, tehát ez az első kísérlet arra, hogy az eddig ismert és más hal fajoknál alkalmazott mélyhűtési módszereket adaptáljuk a rózsás díszmárnára is. Az így kikísérletezett módszer lehetővé teszi pl. genetikailag manipulált állományok hatékony megőrzését.

A spermasűrűség vizsgálata során kapott spermium számok megfelelnek más kutatók által leírt erdeményeknek. Lahnsteiner és munkatársai (2000) pontyféléken végzett kísérletei során az általam számolthoz hasonló eredményeket (1,0-2,0 $\times$ 10^{10} db/ml) kapott paduc (*Chondrostoma nasus*), szilvaorrú keszeg (*Vimba vimba*) és állas küsz (*Chalchalburnus chalcoides*) fajokon.

A mélyhűtéses módszer adaptálása során megállapítottam, hogy a frissen fejt sperma vizsgálatakor kapott motilitási értékek alapján nem határozható meg, hogy melyik hígító felel meg jobban a sperma hígítására. Ugyanis sem a glükóz, sem a ponty hígítóval nem kaptam olyan egyértelmű eltérést a motilitási értékekben, ami alapján kijelenthetném, hogy egyik vagy másik hígító hatással lenne a sperma motilitására. Az eredmények statisztikai értékelése alátámasztja azt, hogy a hígító nem befolyásolja a sperma motilitását.

A felolvasztás utáni motilitás vizsgálatok azt mutatták, hogy amikor DMSO-t használtam védőanyagként, akkor volt a kétféle hígítóban levő spermamintáink motilitása a legmagasabb, tehát a DMSO védőanyag alkalmazása jobb eredményeket adott. A metanol alkalmazásakor a kétféle hígítóban levő minták motilitás értékei ugyan kisebbek lettek, ugyanakkor kiegyenlítettebbek voltak.

Korábbi, a ponty spermájának mélyhűtéséről szóló cikkekben a szerzők (Moczarski, 1977; Kurokura és mtsai, 1984; Koldras és Bieniarz, 1987) igen nagy jelentőséget tulajdonítottak a DMSO-nak. Azonban más halfajokon több kutató – harcsa és pisztrángféléken Steyn és Van Vuren (1987), valamint pontyon Horváth és munkatársai (2003) – sikeresen alkalmazták a metanolt, mint védőanyagot.

A metanol esetében a motilitás vizsgálat után azonnal megkezdtem a hűtést, míg a DMSO-nál 10 perces equilibrációval kellett számolni és csak ezután történt a sperma mélyhűtése, hasonlóan a pontyon végzett kísérletekhez.

Hűtés után a mintákat azonnal felolvasztottam és megvizsgáltam azokat. A minták felolvasztását természetesen egyenként végeztem. A műszalmákat 40ºC-os vízfürdőbe helyeztem 5 másodpercig. Ez a rövid ideig tartó olvasztás nagyságrendileg eltér a többi halfajétól, mint például a pontyétól, amit Lubzens és mtsai (1993) 25ºC-on 2-3 percig végeztek. Ez az időbeli eltérés a rózsás díszmárnából kinyerhető kis mennyiségű sperma, illetve az ehhez használt 0,25 ml-es kis műszalma méretéből adódott. A felolvasztási hőmérsékletben is eltérések mutatkoznak a pontyhoz képest, ugyanis Moczarski (1977) 20-60ºC-on, illetve 0 és 20 ºC-on, Kurokura és munkatársai (1984) 23ºC-on olvasztották fel a mintáikat.

A legnagyobb problémát a halaktól kinyerhető csekély mennyiségű sperma okozta, ugyanis így egy haltól egyszerre nem tudtam több műszalmányi spermát lefejni. Az egy haltól lefejt sperma egyetlen műszalmába került. Ezért a felolvasztáskor nem tudtam kizárólag azokat a mintákat kiválasztani, amelyek a legjobban mozgó spermát adó halból származtak, a gyengébb motilitású mintákat is fel kellett használnom, ezeket nem lehetett kiszűrni.

A műszalma mérete – 0,25 ml – is problémát jelentett, mégis ezt a méretet kellett használnom, ugyanis a mélyhűtésre szakosodott ipar – amely főként szarvasmarha, ló stb. spermájának fagyasztásával foglalkozik – már kiforrott technológiával rendelkezik, amely nem teszi lehetővé az állattenyésztés egyes ágazatai számára a szabványostól való jelentős eltérést.

Ahhoz, hogy a termékenyítéshez megfelelő mennyiségű és minőségű ikra álljon rendelkezésre, nagyon fontos a tejeseket megfelelő körülmények között tartani az ívás idején. A szakirodalom szerint (Horn és Zsilinszky, 1975.) mind a

tenyészpár ívási hajlandósága, mind a nőstény ikrarakása biztosabb, ha az idő derült és elég napfény éri az akváriumot, melyben az ívó halak találhatók. A mesterséges termékenyítés során ügyeltem arra, hogy a hím ne tudja kihajtani a nőstényből az ikrát, ezért 10-15 ikráshoz csak 1-2 tejest raktam be. A reggeli napsugarak a megfelelő mennyiségű és kiváló minőségű ikra levételéhez itt is elengedhetetlenek voltak.

A lefolytatott termékenyítési vizsgálatok azt mutatták, hogy a mélyhűtött spermával kapott eredmények jelentősen gyengébbek a friss spermával végzett kontrolltermékenyítésnél, ám az inkubáció során a termékenyült ikraszemek tovább fejlődtek, tehát az inkubációs időszak alatt már nem volt jelentős veszteség.

Véleményem szerint a termékenyülési eredményeket a sperma-ikra arány szűkítésével, valamint a jó minőségű (magasabb felolvasztás utáni motilitással rendelkező) spermamintákra végzett szelekcióval lehet javítani.

A comet módszert sikeresen adaptáltam rózsás díszmárna ivartermékének vizsgálatára. A comet módszer kiválóan alkalmas a sperma objektív minősítésére, habár a halak spermájának minősítése egyszerűbb és gyorsabb a hagyományos, mikroszkópos becsléssel. A rózsás díszmárnától kinyerhető csekély mennyiségű sperma nem tette lehetővé, hogy egyes egyedek ivartermékét több szalmában, különböző hígítókkal mélyhűtsem, így csak az egyedek közötti varianciát tudtam vizsgálni. Duty és munkatársai megállapították, hogy humán sperma esetében a különböző mélyhűtési technikák csak 6%-ban voltak a variancia forrásai, míg az egy egyedtől származó spermiumok között akár 60% is lehet a különbség (Duty és mtsai., 2002).

6. JAVASLATOK

A vizsgálataim során kapott eredmények alapján a jövőben zajló laboratóriumi és üzemi kísérletekben a következőket javaslom figyelembe venni.

Javaslom afrikai harcsa faj esetében a keltetési körülmények optimalizálását, így kiküszöbölve a fenotípusosan torz lárvák magas arányát a kontroll csoportban, elősegítve így a genetikusan torz lárvák kiszűrését.

Javaslom az afrikai harcsa és a ponty fajok mélyhűtött spermájának keltetőházi használatát szaporítás céljára.

Javaslom ponty faj esetében a cukoralapú hígítók használatát metanol védőanyag kombinálásával.

Javaslom rózsás díszmárna esetében a széleskörű mélyhűtési kísérletek elvégzését, egyéb hígítók használata mellett.

Javaslom rózsás díszmárna esetében a keltetési körülmények optimalizálását a magasabb kelési százalék elérése céljából.

Javaslom a Comet módszer használatát más halfajok spermájának minősítésére is, megtalálva segítségével az optimális hűtőmédiumot.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

- Afrikai harcsa és ponty esetében a mélyhűtött/felolvasztott sperma üzemi szintű alkalmazását lehetővé tevő módszert kidolgozása nagyméretű műszalma alkalmazásával.

- Afrikai harcsa és ponty fajokban a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kis mennyiségben haploid egyedek kelésének regisztrálása.

- Rózsás díszmárna spermájának sikeres mélyhűtése.

- Rózsás díszmárnán comet módszer segítségével kimutatásra került, hogy a metanol védőanyag alkalmazásával hűtött sperma genomja kevésbé károsodik, mint a DMSO jelenlétében hűtött mintáké.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Kutatási célom volt különböző hígítók és fagyásvédő anyagok hatásának vizsgálata a termékenységre és a torzképződésre afrikai harcsa, ponty és rózsás díszmárna hímivarsejtjeinek mélyhűtése során. Célom volt ponty és afrikai harcsa fajoknál nagyméretű műszalmák sikeres alkalmazása, mely lehetővé teszi a laboratóriumi eredmények adaptálását a keltetőházi gyakorlatra.

Afrikai harcsa faj esetében két genetikailag különböző állományból választottam ki a tejes és az ikrás egyedeket. Mindkét nem esetében hormonális indukció előzte meg az ivartermék elvételét. A tejesek spermáját a műtéti úton eltávolított heréből préseltem ki. A spermát 1:1 arányban hígítottam 6% fruktóz alapú hígítóval és 10% metanol, illetve 10% DMSO védőanyaggal. A spermát különböző méretű műszalmákba (0,25; 0,5; 1,2 ml) szívtam fel, majd folyékony nitrogén gőzében végeztem a hűtést. A termékenyítést 15 grammos ikraadagokban végeztem, majd a megtermékenyített ikra inkubációja 1 literes Zuger üvegekben történt. A kromoszómák vizsgálatát nemtáplálkozó lárva stádiumban végeztem el. 50-100 lárvát 0,05% kolchicin oldatban 3 órán át inkubáltam, majd 0,075M KCl oldatban 25 percig hipotonizáltam. A lárvákat 3:1 arányú metanol:ecetsav oldatban fixáltam, majd 50%-os ecetsav oldatban szuszpendáltam. A sejtszuszpenziót előmelegített tárgylemezre cseppentettem, majd megszárítottam. A festés 4%-os Giemsa oldatban 8 percig folyt. Az eredményt 1200-szoros nagyításon értékeltem ki, a jól terült metafázisoknál meghatároztam a kromoszómaszámot. 755 darab lárva preparátumai alapján megállapítottam, hogy sem a termékenyülés, sem a kelési százalék tekintetében nem mutatható ki szignifikáns különbség a használt védőanyagok, illetve hígítók és az alkalmazott műszalmák terén. A preparátumok nagyrésze diploid volt, tehát a fenotípusosan torz lárvák többsége normális kromoszómaszerelvénnyel rendelkezett. Haploid egyedeket csak a mélyhűtött (0,25 és 0,5 ml-es műszalmák) spermával kezelt csoportokban találtam, a kontroll csoportok ép és torz egyedei között nem. Bár a fenotípusos rendellenességet mutató lárvák száma lényegesen meghaladta a kromoszómálisan rendellenesekét, ezzel

együtt szoros összefüggés mutatható ki a morfológiai és a citogenetikai rendellenességek között, hiszen az általam megvizsgált abnormális kromoszómagarnitúrával rendelkező összes egyed fenotípusosan is torz volt.

Második kísérletem alanya a ponty volt, a nagyméretű műszalmák használatát vizsgáltam. Az ikrás halaktól az ivarterméket hormonkezelés útján nyertem ki, a tejes halaktól hormonkezelés nélkül. A mélyhűtés során hígítóként: 350 mM glükózt, védőanyagként 10% metanolt használtam. A hígítási arány 1:9 volt. A felhígított spermát különböző méretű műszalmákba, 1,2 és 4 ml szívtam fel, majd folyékony nitrogén gőzében hűtöttem. A termékenyítés után az ikrát 7 literes Zuger üvegekben inkubáltam. A kromoszómavizsgálat az afrikai harcsánál leírtakhoz hasonlóan zajlott. A 260 db eddig megvizsgált lárva preparátum legnagyobb része diploid (102±2 darab kromoszóma) volt, tehát a torz lárvák többsége normális kromoszómaszerelvénnyel rendelkezik.

Egyértelműen megállapítható haploid lárvát (51 kromoszóma) 4 kezelésben találtam, 1,2 ml-es műszalma esetén a 20 és 30 grammos tételekben, míg a 4 ml-es szalma használatánál a 40 és 80 grammos adagban végzett termékenyítések esetén. A torz lárvák aránya az összes kikelt lárvához képest 0 és 15% között alakult.

Általánosságban elmondható, hogy mind a használt műszalmák mérete ($p=0,0186$), mind az ikra mennyisége ($p=0,0093$) statisztikailag szignifikáns hatást gyakorolt a kelési eredményekre.

A felhasznált ikra mennyisége szignifikáns hatást gyakorolt a torzak arányára ($p=0,0032$) a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kelt lárvák esetében, azonban a felhasznált szalma mérete nem volt szignifikáns hatással rá.

A kísérletek alapján megállapítható, hogy mind az ikra mennyisége, mind az alkalmazott szalmák mérete szignifikáns hatással volt a kelési százalékra. A torzak aránya a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kelt lárvák esetében szignifikáns különbséget mutatott az ikra mennyiségére nézve. A torzak aránya a mélyhűtött spermával termékenyített ikrából kelt lárvák esetében nem mutatott szignifikáns különbséget a sperma mennyiségére nézve.

A harmadik kísérlet során különböző hígítókat teszteltem ponty fajon. Az ötféle hígítót (szacharóz, glukóz, fruktóz, KCl és ponty hígító) metanol és DMSO védőanyag mellett használtam. A hűtési procedúra megegyezett az előzőekben leírtakkal, azonban ennél a kísérletnél 0,5 ml-es műszalmát használtam. Az eddig ponytféléknél mellőzött metanollal magasabb és kiegyenlítettebb motilitási, termékenyülési és kelési eredményeket értem el, mint az eddigiekben használt DMSO-val. A hígítók közül a cukoralapúak, leginkább a glükóz bizonyult megfelelőnek ennél a halfajnál. A cukoralapú hígítóknál tapasztalt agglutináció nem befolyásolja a kelési eredményeket.

Az utolsó kísérletben rózsás díszmárna spermájának sikeres mélyhűtését végeztem el. A tejeseket pipetta segítségével fejtem le, az ivarterméket glükóz vagy ponty hígítót tartalmazó csövekbe tettem. A motilitás vizsgálat során nem mutatkozott jelentős különbség a két hígító között. Elvégeztem a mélyhűtést metanol és DMSO védőanyagokkal 0,25 ml-es műszalmákban, majd felolvasztás után megtermékenyítettem az ikratételeket. A felolvasztás utáni motilitás vizsgálat során nem volt szignifikáns különbség egyik hígító alkalmazásakor sem a két védőanyag függvényében. A termékenyülés vizsgálatakor a ponty hígító-DMSO védőanyag adta a legmagasabb eredményt. Comet módszerrel a nem roncsolódott sejtek aránya metanol védőanyag használata során 47% volt, míg DMSO alkalmazásakor csak 5,2%-ban fordultak elő ép sejtek.

9. SUMMARY

The objective of my research work was to analyze the effects of extenders and cryoprotectants on fertilization and larval malformation in the process of cryopreservation of sperm of common carp, African catfish and rosy barb. A further objective was the utilization of large straws in case of the common carp and African catfish to facilitate the application of laboratory results to the hatchery practice.

Males and females of African catfish were selected from two genetically different stocks. Collection of gametes was initiated in both sexes by hormonal induction. Sperm was extracted from surgically removed testes. Sperm was diluted 1:1 in an extender composed of 6% fructose and cryoprotectants methanol and DMSO in 10% concentration. Sperm was loaded into straws of different volumes (0.25; 0.5; 1.2 ml) and frozen in the vapor of liquid nitrogen. Fertilization with cryopreserved sperm was conducted in batches of 15 g of eggs which were then incubated in one-liter Zuger-type hatching jars. Choromosome preparations were carried out on non-feeding larvae. Fifty to one hundred larvae were incubated for 3 hours in a 0.05% colchicine solution, then placed into a hypotonic solution of 0.075M KCl for 25 minutes. Cell suspensions were spread on a pre-heated microscope slide and dried. Slides were stained in 4% Giemsa for 8 minutes. Results were evaluated at 1200× magnification and chromosome numbers were determined on well-spread metaphases. No significant differences were found among the fertilization or hatch rates in terms of extenders, cryoprotectants or used straw sizes. Most of the 755 analyzed larvae were diploids thus most phenotypically malformed larvae had a normal set of chromosomes. Haploid individuals were found only in groups fertilized with cryopreserved sperm (frozen in 0.25 and 0.5 ml straws) but not among either the intact or the malformed larvae of the control. Larval malformation in most cases is not of genetic origin and cannot be attributed to cryopreservation. Although the number of phenotypically malformed larvae has vastly exceeded that of larvae with chromosome alterations, a high correlation can be found between morphological and cytogenetic malformations as all investigated

larvae with chromosomal alterations were at the same time phenotypically deformed.

In the experiments on common carp the effects of large straws were examined. Gametes were collected from females following hormonal induction whereas from males without hormonal treatment. An extender composed of 350 mM glucose and 10% methnaol was used for cryopreservation of sperm. Dilution ratio was 1:9. Diluted sperm was loaded into straws of different sizes (1.2 and 4 ml) and frozen in the vapor of liquid nitrogen. Following fertilization eggs were incubated in 7 liter Zuger-type hatching jars. Chromosome analysis was conducted similarly to that described at the experiments on African catfish. Most of the 260 larvae analyzed so far were diploids (102±2 chromosomes) thus most malformed larvae had no chromosomal alterations.

Definitely haploid larvae (with 51 chromosomes) were found in 4 treatments, in case of 1.2 ml straws in the 20 and 30 g groups and in case of 4 ml straws in the 40 and 80 g groups. The ratio of malformed larvae ranged from 0 to 15 % of all larvae.

In general, the size of straws (P=0.0186) and the volume of fertilized eggs (P=0.0093) had a significant main effect on the hatch rates.

The volume of fertilized eggs had a significant main effect (P=0.0032) on the ratio of malformed larvae, whereas the size of straws had no such effect.

Different extenders were tested in the third experiment on common carp. The five extenders (sucrose, glucose, fructose, KCl and carp extender) were used with cryoprotectants methanol and DMSO. Conditions of freezing were the same as described above although in this experiment 0.5 ml straws were used. Higher and more balanced results were observed with the so far avoided methanol than with the conventional DMSO. Sugar-based extenders, mainly glucose, were found most suitable for this species. Agglutination found in sugar-based extenders does not have an impact on hatch rates.

Successful cryopreservation of rosy barb sperm was conducted in the last experiment. Males were stripped with a pipette and sperm was collected into centrifuge tubes containing either glucose or carp extender. No significant difference in sperm motility was observed between the tow extenders. Cryopreservation was carried out using cryoprotectants methanol and DMSO in 0.25 ml straws and fertilization tests were carried out following thawing. No significant effect of extenders or cryoprotectants was observed on the post-thaw motility. The highest fertilization rate was observed with the combination of carp extender and DMSO. Damage to sperm DNA was analyzed using the Comet assay and the ratio of cells with intact DNA was 47% in case of methanol whereas only 5.2% in.

.

10. IRODALOMJEGYZÉK

Anderson D., Yu T-W., Philips BJ, Schmezer P. 1998. The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical-generated DNA damage in human lymphocytes in the Comet assay. Mutation Research, 307: 261-271.

Arakawa, T., Carpenter, J. F., Kitam, Y. A., Crowe, J. H., 1990. The basis for toxicity of certain cryoprotectants: a hypotesis. Cryobiology, 27: 401-415.

Ashwood-Smith, M. J. 1986. The cryopreservation of human embryos, Human Reproduction, 1: 319–332.

Bacetti B., Afzelius B.A. 1976. The Biology of the Sperm Cell. pp. I-155. In: Monographs in Developmental Biology, Vol. 10. Szerk.: Wolsky A. S. Karger, Basel

Baynes, S. M. and Scott, A. P. 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality, egg quality and extender composition on post-thaw fertility. Aquaculture, 66: 53-67.

Billard R. 1978. Some data on gametes preservation and artificial insemination in teleost fish. Actes de Colloques du Centre Nationale de l'Eexploitation des Oceans (CNEXO) 8: 59-73.

Blaxhall, P. C. 1983. Chromosome karyozyping of fish using conventional and G-anding methods. Journal of Fish Biology, 22: 37-44.

Blaxter J. H. S. 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring. Nature 172: 1189-1190.

Böcker W., Rolf W., Bauch T., Müller W., Streffer C. 1999. Autamated comet assay analysis. Cytometry 35: 134-14.

Cabrita E., Alvarez R., Anel L., Rana K.J. and Herraez M.P. 1998. Sublethal Damage during Cryopreservation of Rainbow Trout Sperm. Cryobiology, 37/3: 245-253.

Cherepanov V.V., Drokin S.I., Ochkur S.I., Dzuba B.B., Chikhachov A.S. & Kopeika E.F. 1993. Freezing of sperm of the Azov-Black Sea Acipenserids. International Symposium on Sturgeons, Sept. 6-11, 1993 Moscow-Kostroma-Moscow, Abstract Bulletin p. 63.

Cherfas, N. B. 1971. Natural and artificial gynogenesis of fish. Aim of selection and methods of articicial selection. In. Study tour in the U.S.S.R. on genetic selection and hybridization of cultivated fishes. Food and agriculture organization of the United Nations, Rome, pp: 274-292.

Chourrout, D. 1982. Tetraploidy induced by heat shocks in the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Reprod. Nutr. Dev., 22:569-574.

Chrisman, C. L., Blacklidge, K. H. and Riggs, P.K. 1990. Chromosomes of fish. In: Richard A. Mc Feely (ed): Domestic animal cytogenetics, Advences in Veternary Science and Comparative Medicine, Academic Press Inc. 34: 209-227.

Ciereszko, A., Dabrowski, K., Froshauer, J. and D. Wolf, T. 2006. Cryopreservation of Semen from Lake sturgeon. Transactions of the American Fisheries Society, 135: 232-240.

Denton, T. E. 1973. Fish chromosome Metholody. Thomas, Springfield „Genetics and Mutagenesis of Fish" pp. 33-52. SpringerVerlag, New York.

Denton, T. E. and Howell, W. M. 1969. A technique for obtaining chromosomes from the scale epithelium of teleost fishes. Copeia, 392-393.

Dettlaff, T. A., Ginsburg, A. S. and Schmalhausen, O.I. 1993. Sturgeon fishes. Springer-Verlag, Berlin.

Dinnyés, A., 1993. Az emlősembriók mélyhűtésének új módszerei, különös tekintettel az in vitro fertilizációval elõállított szarvasmarha-embriókra. Kandidátusi értekezés, Kézirat, Budapest

Drokin, S., Stein, H. and Bartscherer H. 1998. Effect of Cryopreservation on the Fine Structure of Spermatozoa of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) and Brown Trout (*Salmo trutta F. fario*). Cryobiology, 37/3: 263-270.

Duty, S. M., Singh, N. P., Ryan, L., Chen, Z., Lewis, C., Huang, T. and Hauser, R. 2002. Reliabity of the comet assay in cryopreserved human sperm. Human Reproduktion 17:1274-1280.

Fairbairn, D. W,. Olive, P. L., O'Neil K. L. 1995. The Comet assay: a comprehensive review. Mutation Research 339: 37-59.

Gedik, C. M., Ewen, S. W. B., Collins, A. R. 1992. Single-cell gel electhrophoresis applied to the analysis of UV-C damage and its repair in human cells. International Journal of Radiation Biology 62: 313-320.

Glenister, P. H. and Lyon, M. F. 1986. Long term storage of eight-cell mouse embryos at -196 °C. Journal of In Vitro Fertilisation and Embryo Transfer, 3: 20-27.

Glogowski, J., Kolman, R., Szczepkowski M., Horvath, A., Urbanyi, B., Sieczynski, P. and Ciereszko, A. 2002. Fertilization rate of Siberian sturgeon

(*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. Aquaculture 211: 367-373.

Goin, O. B. and Goin, C. J. 1968. DNA and the evolution of the vertebrate. Am. Midl. Nat. 80: 289-298.

Gurungunta, A., Vasquez M., Tice R. R. 1996. Charactherization of the Single Cell Gel (SCG) assay: alcohol dried slides versus conventional slides. Environmental Mol. Mutagen 27 (S27): 27.

Hartley, S. E. 1987. The chromosomes of salmonid fishes. Biol. Rev. Cambridge Philos. Soc. 62: 197-214.

Harvey, B., Ashwood-Smith M. J. 1982. Cryoprotectant penetration and supercooling in the eggs of salmonid fishes. Cryobiology, 20: 432-439.

Harvey, B., Kelley, N. and Ashwood-Smith, M. J., 1983. Permeability of intact and dechorionated zebra fish embryos to glycerol and dimethyl sulfoxide, Cryobiology, 20: 432–439.

Horn P. és Zsilinszky S. 1975. Akvarisztika. Natura Kiadó, Budapest, 165-167.

Horváth Á., Miskolczi E., Urbányi B. 2003. Cryopreservation of common carp sperm. Aquatic Living Resources 16: 457-460

Horváth Á. and Urbányi B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish Clarias gariepinus (Burchell, 1822) sperm. Aquaculture Research 31/3:317-324

Hsu, T. C. and Pommerat, C. M. 1953. Mammalian chromosomes in vitro II., A method for spreading the chromosomes of cells in tissue culture. Journal of Heredity, 44: 23-29.

H. Tamás G., Horváth, L., Tölg, I. 1982. Tógazdasági tenyészanyag-termelés. 245-248. Mezőgazdasági Kiadó, Budapest

Imreh, Sz. I. 1986. A kromoszóma. Kriterion Könyvkiadó, Bukarest.

Kirankumar, S. and Pandian, T. J. 2004. interspecific androgenetic restoration of rosy barb using cadaveric sperm. Genome 47:66-73.

Kizilian N., Wilkins R. C., Reinhardt P., Ferrarotto C., McLean J. R. N., McNamee J. P. 1999. Silver-stained comet assay for detection of apoptosis. Biotechniques, 27: 926-930.

Klaude M., Erikson S., Nygren J. and Ahnstrom G. 1996. the comet assay: mechanism and technical considerationa. Mutation Research, 363: 89-96.

Kligerman, A. D. and Bloom, S. E. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 34: 266-269.

Kobayashi H., Sugiyama C., Morikawa Y., Sofuni T. 1995. A comparison between manual microscopic analysis and the computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. MMS Commun 3: 103-115.

Koldras M. and Bieniarz, K. 1987. Cryopreservation of carp sperm. Polskie Archiwum Hydrobiologii 34: 125-134.

Kurokura H., Hirano R. 1980. Cryopreservation of Rainbow trout sperm. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries 46: 1493-1495.

Kurokura H., Hirano R. Tomita M., Iwahashi M. 1984. Cryopreservation of carp sperm. Aquaculture 37: 267-273.

Labbe C, Martoriati A, Devaux A, Maisse G. 2001. Effect of sperm cryopreservation on sperm DNA stability and progeny development in rainbow trout. Molecular Rep. Dev., 60 (3): 397-404

Lahnsteiner F., Weismann T. and Patzner R.A. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1,2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquaculture Research 28, 471-479.

Lahnsteiner F. B. Berger, Á. Horváth, B. Urbányi, Weismann T. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. Theriogenology 54: 1477-1498.

Leibo S. P. 1980. Water Permeability and its Activation Energy of Fertilized and Unfertilized Mouse Ova. Journal of Membrane Biology, 53: 179-188.

Leung, L. K. P. 1991. Principles of biological cryopreservation. In: Jamieson, B. G. M. and Leung, L. K. P. (eds): Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Cambridge University Press.

Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Gela, D. and Kocour, M. 2005. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: Sperm motility, viability and hatching success of embryos. Cryobiology 51:250-261.

Lubzens, E., Rothbard, S., Hadani, A. 1993. Cryopreservation and viability of spermatozoa from the ornamental japanese carp (nishikigoi). Bamidgeh, 45:4:169-174.

Magyary I. 1993. Kísérletek kecsege (Acipenser ruthenus L.) és a lénai tok (Acipenser baeri Brandt) spermájának mélyhűtésére. Diplomamunka (Gödöllői Agrártudományi Egyetem), Kézirat

Magyary I., Urbányi B., Hilge V. 1996. Simple, inexpensive, portable and efficient method for fish sperm freezing. Congress of Refrigeration and Aquaculture, Bordeaux, 20-22 March.

Márián, T. 1978. Halkariológiai vizsgálatok, Halhústermelés fejlesztése, Halászati és Öntözési Kutatóintézet.

Mc. Feely, A. R., 1990. Domestic animal cytogenetics, Advences in Veternary Science and Comparative Medicine, Volume 34. Academic Press Inc. pp. 209-227.

McKelvey-Martin V. J., Green M. H. L., Schmezer P., Pool-Zobel B. L., De Meo M. P., Collins A. 1993. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review. Mutation Research, 288: 47-63.

Moczarski, M. 1977. Deep freezing of carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm. Bulletin De La Académie Polonaise Des Sciences, Serie des sciences biologiques 24:3, 187-190.

Nace, G. W., Richards, C. M. and Asher, J. H. 1970. Parthenogenesis and genetic variability. I. Linkage and inbreeding estimations in the frog, *Rana pipiens*. Genetics, 66: 349-368.

Nagy, A., Rajki, K., Horváth, L., Csányi, V. 1978. Investigation on carp, (*Cyprinus carpio*, L.) gynogenesis. Journal of Fish Biology, 13: 215-224.

Ohno, S. and Atkin, N.B. 1966. Comparative DNA values and chromosome complements of eight species of fishes. Chromosome 18: 455-466.

Ohno, S., Buramoto, J., and Christensen, L. 1967. Diploid-tetraploid relationship among old-world members of the fish family, Cyprinidae. Chromosome, 23: 1-9.

Ohno, S., Wolf, U., and Atkin, N. 1968. Evolution from fish to mammals by gene duplication. Hereditas, 59: 169-187.

Ohno, S., Muramoto, J., and Christensen, L. 1969. Microchromosomes in holocephalian, chondrostean and holostean fishes. Chromosome, 26: 35-40.

Ogier de Baulny B., Labbé C. and Maisse G. 1999. Membrane Integrity, Mitochondrial Activity, ATP Content, and Motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) Testicular Spermatozoa after Freezing with Different Cryoprotectants. Cryobiology, 39/2: 177-184.

Olive P. L. 1989. Cell proliferation as a requirement for development of the contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. Radiation Research, 117: 79-92.

Östling O., Johanson K. J. 1984. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in induvidual mammalian cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 123: 291-298.

Péteri, A. és mtsai. 1989. Az afrikai harcsa (Clarias gariepinus) tenyésztése. Halászat 82 (3): 86-91.

Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S**.** 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature, 164: 666.

Purdom, C. E. 1969. Radiation-induced gynogenesis and androgenesis in fish. Heredity, 24: 431-444.

Rabl, K. 1985. Über Zellteilung, Morph, Jb. Leipzig, 10: 214-243.

Ramirez, S.A. 1980. A modified technique for fish karyotype analysis using scale epithelium. Copeia 543-545.

Rana, K. J. and McAndrew, B. J. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Acquaculture, 76: 335-45.

Rojas E., Lopez M. C., Valverde M. 1999. Single cell gel electrophpresis assay: methology and applications. Journal of Chromatogaphy B 722: 225-254.

Rurangwa, E., Kime, D. E., Olivier, F. and Nash, J. P. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture 234: 1-28.

Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., Schneider E. L. 1988. A simple technique for quantation of low levels of DNA damage in individual cells. Experimental Cell Research 175: 184-191.

Singh N. P., Stephens R. E., Schneider E. L. 1994. Modifications of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. International Journal of Radiation Biology, 66: 23-28.

Smith, A. U. and Polge, C. 1950. Storage of bull spermatozoa at low tempratures. Veternary Record, 62: 115-116.

Sneed, K.E., Clemens, H.P. 1956. Survival if Fish Sperm After Freezing and Storage at Low Temperatures. The Progressive Fish-Culturist, 18: 99-103.

Steyn, G. J., Van Vuren, J.H.J. 1987. The fertilizing capatity of cryopreserved Sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. Aquaculture, 63: 187-193.

Stanley, J. G., Sneed, E. 1973. Artificial Gynogenesis and its Application in Genetics and Selective Breeding of Fish. (Editor: Blaxter, J. H. S.), The Early Life History of Fish. The Proceedings of an Int. Symp.at Oban, Scotland, Springer-Verlag, Berlin, Germany, pp. 527-536.

Stewart, D. L. 1951. Storage of bull spermatozoa at low temperatures Veternary Record, 63: 56.

Thorgaard, G. H. and Disney, J. E. 1990. Chromosome preparation and Analysis. In: Schreck, C. B. and Moyle, P.B. (szerk.) Methods for Fish Biology, American Fisheries Society, Bethesda pp. 171-190.

Thorgaard, G.H., Jazwin, M.E.and Stier, A.R. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. Transaction of the American Fisheries Society, 110: 546-550.

Tice, R.R. 1995. The single cell gel /comet assay: A microgel electrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: Phillips D. H., Venitt S., editors. Environmental mutagenesis. Oxford: Biosscientific Publishers, 315-339.

Tice, R. R., Andrews P. W., Hirai O., Singh N. P. 1991. The single cell gel (SCG) assay: an electrophoretic technique for the detection of DNA damage in individual cells. In: Witmer C. R., Snyder R. R., Jollow D. J., Kalf G. F., Kocsis J.

J., Sipes I. G., editors Biological reactive intermediates IV. Molecular and cellular effects and their impact on human health. New York: Plenum Press. 157-164.

Tice, R. R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Mamae Y., Rojas E., Ryu J.-C., Sasaki Y.F. 2000. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. Environmental and Molecular Mutagenesis, 35: 206-221.

Tice, R. R., Furedi-Machacek M., SatterfieldD., Udumudi A., Vasquez M., Dunnick J. K. 1998. Measurement of micronucleated erythrocytes and DNA damage during chronic ingestion of phenolphthalein in transgenec female mice heterozygous for the *p53* gene. Environmental Moleculary Mutagen, 31: 113-124.

Tiersh, T. R., Figiel, C. R., Wayman, W. R., Wiliamson, J. H., Gorman, O. T. and Carmichael, G. J. 2004. Cryopreservation of sperm from the endangered Colorado pikeminnow. North American Journal of Aquaculture 66:8-14.

Urbányi, B., Horváth, Á., Billard, R., Fierville, F. és Horváth, L. 1998. Módszer tokfélék spermájának mélyhűtésére. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 1998. május 24-25. Előadás

Urbányi, B., Horváth, Á. és Kovács B. 2003. Succesful hybridization of Acipenser species using cryopreserved sperm. Aquaculture International, LI-7:1-10.

Váradi, L. 2000. Halgenetika. In: Horváth, L (szerk.): Halbiológia és haltenyésztés, Mezőgazda Könyvkiadó, Budapest, pp: 99-142

Várkonyi, E. 1997. Embriogenetikai vizsgálatok madár- és csontoshal fajokon. Kandidátusi értekezés (KÁTKI) kézirat.

Velasco-Santamaria, Y., M., Medina-Robles, V. M. and Cruz-Casallas, P.E. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. Aquaculture 256:264-271.

Vijayalaxmi, Tice R.R., Strauss G. H. S. 1992. Assessment of radiation-induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single cell gel electrophoresis rechnique. Mutation Research, 271: 243-252.

Wolf, K. and Ahne, W. 1982. Fish cell culture. 305-328. In: K. Maramorosch, (szerk): Advances in cell culture, volume 2. Academic Press, New York.

Wolters, W. R., Chrisman, C. L. and Libey, G. S. 1981. Lymphocyte culture for chromosomal analyses of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Copeia, pp. 503-504.

Yamaki, M., Kawakami, K., Taniura, K. and Arai, K. 1999. Live Haploid-diploid Mosaic Charr *Salvelinus leucomaenis*. Fisheries Science, 65 (5): 739-741.

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK

11.1 TUDOMÁNYOS FOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT KÖZLEMÉNYEK

Miskolczi E., Mihálffy Sz**.**, Patakiné Várkonyi E., Urbányi B., Horváth Á. 2002. Lárvakori torzulások vizsgálata mélyhűtött sperma alkalmazása során. Halászatfejlesztés, 27: 127-134.

Á. Horváth, **E. Miskolczi**, B. Urbányi. 2003. Cryopreservation of common carp sperm. Aquatic Living Resources, 16: 457-460.

E. Miskolczi, Á. Horváth, Sz. Mihálffy, E. Patakiné Várkonyi, B. Urbányi, 2005. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. Aquaculture, 247: 119-125.

B. Urbányi, T. Szabó, **E. Miskolczi,** Sz. Mihálffy, K. Vranovics**,** Á. Horváth, 2006. Cryopreservation of sperm of four European cyprinid species. Journal of Applied Ichtiology, 22: 201-204.

11.2. EGYÉB KÖZLEMÉNYEK

Miskolczi E. 2000. Vízterületek jellemzése egy halfaj, az ezüstkárász segítségével. Egyetemi Tudományos Diákköri Konferencia, Környezetvédelmi szekció, első helyezés, Gödöllő

Váradi, L. Decker, K., Tóth, B. és **Miskolczi, E**. 2000. Gyomhalak a magyar haltenyésztésben. A tiszai ciánszennyezés hatása az egyes halfajokra. II. Halászati Szakmai Napok, Előadás, SzIE, Gödöllő

Miskolczi E., Tóth B. és Váradi L. 2000. Vízterületek jellemzése egy halfaj, az ezüstkárász segítségével. II. Halászati Szakmai Napok, Előadás, SzIE, Gödöllő

Miskolczi E. 2001. Vízterületek jellemzése egy halfaj, az ezüstkárász segítségével Országos Tudományos Diákköri Konferencia, Környezetvédelmi szekció 3. helyezés, Sopron

Miskolczi E., Tóth B., Váradi L. 2001. Vízterületek jellemzése egy halfaj, az ezüstkárász segítségével. XXV. Halászati Tudományos Tanácskozás. Előadás, Összefoglaló: 16., Szarvas

Váradi L., **Miskolczi E**. 2002. Rekviem egy tórendszerért. Természetbúvár Magazin, 57. évf. 6. szám.

Mihálffy Sz**.**, **Miskolczi E**., Patakiné Várkonyi E., Urbányi B., Horváth Á. 2003. Lárvakori torzulások vizsgálata afrikai harcsán (*Clarias gariepinus)* mélyhűtött sperma alkalmazását követően. XXVII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Előadás, Összefoglaló: 30., Szarvas

Vranovics K., Horváth Á., **Miskolczi E**., Urbányi B. 2003. Pontysperma mélyhűtése különböző hígítók és védőanyagok felhasználásával. XXVII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Előadás, Összefoglaló: 15., Szarvas

B. Urbányi, **E. Miskolczi**, Sz. Mihálffy, E. Patakiné Várkonyi, Á. Horváth 2003. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus* following fertilization with cryopreserved sperm. World Aquaculture 2003, Salvador, Brazília, 2003. május 19-23. Előadás, Összefoglaló: 800.

E. Miskolczi, Á. Horváth, Sz. Mihálffy, E. Patakiné Várkonyi, B. Urbányi, 2003. Examination of larval malformations in African catfish *Clarias gariepinus*

following fertilization with cryopreserved sperm. VIII Genetics in Aquaculture, Puerto Varas, Chile, 2003. november 9-15. Előadás, Összefoglaló: 46.

E. Miskolczi, B.Urbanyi, T. Szabó, Sz. Mihalffy, K. Vranovics, Á. Horváth 2004. Cryopreservation of sperm of different cyprinid species. IV. Student Conference on Conservation Science in Cambridge, United Kingdom, 2004. március 24-26. Poszter, Összefoglaló: 17.

Miskolczi E., Urbányi B., Ősz K., A. Devaux, Horváth Á. 2004. A „comet assay", mint a genetikai károsodások kimutatásának új módszere. XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Előadás, Összefoglaló: 11., Szarvas

Vranovics K., Ősz K., **Miskolczi E**., Urbányi B., Horváth Á. 2004. Rózsás díszmárna (*Barbus conchonius*) spermájának mélyhűtése. XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Poszter, Összefoglaló: 25., Szarvas

Mihálffy Sz., **Miskolczi E**., Urbányi B., Horváth Á. 2004. Hazai folyóvízi pontyfélék hímivarsejtjeinek mélyhűtése. XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Poszter, Összefoglaló: 27., Szarvas

E. Miskolczi, B. Urbányi Á. Horváth, 2005. Cryopreservation of common carp sperm, Aquaculture America 2005, New Orleans, Louisiana, USA., Poszter, Összefoglaló: 275.

Sz. Mihálffy, B. Urbányi, T. Szabó, **E. Miskolczi,** K. Vranovics**,** Á. Horváth, 2005. Cryopreservation of sperm of four European cyprinid species, Aquaculture America 2005, New Orleans, Louisiana, USA., Poszter, Összefoglaló: 282.

12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton kívánok köszönetet mondani mindenkinek, aki közvetve vagy közvetlenül, bármilyen formában hozzásegítettek eredményeim eléréséhez, ezen dolgozat megvalósulásához. Mivel név szerint nem áll ódonban valamennyiüket megemlíteni, így az alábbiakban a legfontosabb személyeket, intézményeket emelem ki.

Hálával tartozom Szüleimnek, akik támogatása, ösztönzése nélkül nehezen vészeltem volna át a néha nehéz, monoton, embert próbáló hétköznapokat, melyből bőven akadt tanulmányaim során. Gyermekkorom óta arra neveltek, hogy a kitűzött céljaimat megvalósítsam és ennek elérésében maximálisan mellettem álltak. Édesapám horgászszenvedélye révén kerültem először kapcsolatba a halakkal.

Köszönettel tartozom Horváth László professzor úrnak, aki óriási odaadással vezette az általa alapított Halgazdálkodási Tanszéket. Szakmai tudása és emberi nagysága előtt fejet hajtva boldog vagyok, hogy az ő irányítása mellett sajátítottam el egyetemi majd doktori tanulmányaim során a szakma rejtelmeit.

A Tanszék kollektívája az évek során baráti közösségé vált, melyben mindenkor számíthattam a többiek önzetlen segítségére. Köszönöm mindannyiuknak, hogy az az 5 év, melyet a Tanszéken töltöttem, nem fásult munkahelyi hangulatban, hanem vidám, jókedvű társaságban telt.

Sokat köszönhetek egykori diáktársaimnak, akik ma is a Tanszéken dolgoznak. Név szerint Hegyi Árpádnak, Tóth Balázsnak és Csorbai Balázsnak. Mihálffy Szilviával sok-sok hónapot töltöttünk el közös munkával, köszönettel gondolok rá amikor e sorokat írom.

Szakmai vezetőim közül elsőként Dr. Váradi Lászlónak szeretnék köszönetet mondani, aki témavezetőm volt egyetemi tanulmányaim során és ösztönzött a doktori képzés elkezdésére.

Köszönetet szeretnék mondani a Kisállattenyésztési és Takarmányozási Kutató Intézet munkatársainak. Dr. Hidas Andrásnak, aki lehetővé tette, hogy az általa vezetett intézetben sajátíthassam el a kutatásaimhoz szükséges fogásokat.

Köszönöm Patakiné Dr. Várkonyi Eszternek a türelmes délutánokat, melyet a laborban együtt töltve bevezetett a kromoszóma preparálás rejtelmeibe.

Köszönettel tartozom Dr. Varga Lászlónak és Dr. Kovács Balázsnak a Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet kollégáinak, hogy együtt dolgozhattam velük.

Köszönöm Szabó Krisztiánnak, hogy az általa vezetett Haltermelők Országos Szövetségének Dinnyési Ivadéknevelő Gazdságában évről évre szívesen láttak, lehetővé tették kísérleteink elvégzését keltetőházi körülmények között.

Köszönettel tartozom Dr. Horváth Ákosnak. Az ő szakmai irányítása mellett végeztem minden kísérletemet, végig együtt dolgoztunk a doktori képzésem során. Önzetlen segítségére mindenkor számíthattam. Szakmai tudása, alapossága, iránymutatása példaértékű számomra. Lelkiismeretes munkája nagyban hozzásegített eredményeim eléréséhez.

Utolsóként témavezetőmnek, Dr. Urbányi Bélának szeretnék köszönetet mondani, aki a doktori tanulmányaim során mindig önzetlenül támogatott. Számára nem létezett lehetetlen, ha egy szakmai kérdés megoldásra várt. Mindig, mindenhez megteremtette a feltételeket, szakmai vezetése alatt öröm volt dolgozni. Bármilyen problémával fordultam hozzá, biztos lehettem benne, hogy kitűnő és gyors megoldást ajánl.