



Szent István Egyetem

HALSPERMA ÉS -SPERMATOGÓNIUMOK VITRIFIKÁCIÓJA

KÁSA ESZTER

Gödöllő

2017

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudomány

vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, akadémikus

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Állattudományi Alapok Intézet

Takarmányozástani Tanszék

Témavezetők: Dr. Horváth Ákos

tudományos főmunkatárs, kutatási csoport felelős

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet

Halgazdálkodási Tanszék

Dr. Urbányi Béla

tanszékvezető, egyetemi tanár, MTA doktora

Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet

Halgazdálkodási Tanszék

.....

.....

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

A témavezetők jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK	3
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	6
1. BEVEZETÉS	7
1.1. Célkitűzések	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1. A halak szaporodásbiológiai sajátosságai	10
2.1.1. A nőivarú halak szaporodásbiológiai sajátosságai	10
2.1.2. A hímivarú halak szaporodásbiológiai sajátosságai	11
2.1.3. A termékenyülés folyamata halaknál	14
2.2. Spermaminósítási módszerek	15
2.2.1. A spermiumok motilitásának objektív mérése a CASA rendszerrel	15
2.2.2. A spermiumok morfometriájának szoftveres elemzése	17
2.2.3. Membránintegritás vizsgálat	18
2.2.4. Termékenyítési tesztek	19
2.2. Spermamélyhűtési eljárások	20
2.2.1. Lassú hűtés	22
2.2.2. Vitifikáció	23
2.3. Spermátogónium- és primordiális őssejt-mélyhűtési eljárások	28
2.4. Az intracelluláris védőanyag-koncentráció csökkentésének lehetőségei	28
2.4.1. Fehérje kiegészítés	28
2.5.2. Szénhidrát kiegészítés	30
2.5.3. Koleszterol kiegészítés	31
2.6. A kísérleti halfajok jelentősége	31

2.6.1. Laboratóriumi modell halfaj	31
2.6.2. Természetvédelmi szempontból jelentős halfajok	32
2.6.3. Gazdasági jelentőségű halfajok	32
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	33
3.1. Kísérleti állomány és sperma minősítés	33
3.1.1. Lazacfélék	38
3.1.2. Pontyfélék	40
3.1.3. Sügérfélék	41
3.1.4. Angolnafélék	43
3.2. Spermátogóniumok vitrifikációja	44
3.2.1. Zebradánió spermátogóniumok vitrifikációja	45
3.2.2. Ponty spermátogóniumok vitrifikációja	47
3.3. Statisztikai analízis	47
4. EREDMÉNYEK	48
4.1. Sperma vitrifikáció: lazacfélék	49
4.1.1. Pénzes pér sperma vitrifikációja	49
4.1.2. Márványpisztráng sperma vitrifikációja	51
4.2. Sperma vitrifikáció: pontyfélék	52
4.2.1. Zebradánió-sperma vitrifikációja	52
4.2.2. Pontysperma vitrifikációja	54
4.2.3. Compósperma vitrifikációja	55
4.3. Sperma-vitrifikáció: sügérfélék	57
4.4. Sperma-vitrifikáció: angolnafélék	59
4.4.1. A spanyolországi angolnaállományon végzett vizsgálatok	59
4.4.2. A magyarországi angolnaállományon végzett vizsgálatok	61
4.5. Spermátogónium vitrifikáció	62
4.5.1. Zebradánió spermátogónium vitrifikáció	62

4.5.2. Ponty spermatogónium vitrifikáció.....	62
5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	64
5.1. Halsperma-vitrifikáció	64
5.2. Hereszövet vitrifikáció	68
5.3. Javaslatok	69
6. Új tudományos eredmények.....	70
7. ÖSSZEFOGLALÁS.....	71
8. SUMMARY	73
9. MELLÉKLETEK.....	75
M1. Irodalomjegyzék.....	75
M2. A vizsgálatok során használt oldatok összetétele	101
10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	102

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- **AFP:** fagyásgátló fehérje
- **ASMA:** számítógép-vezérelt spermium-fej morfometriai vizsgálat (Computer Automated Sperm head Morphometry Analysis)
- **BSA:** szarvasmarha szérum albumin (Bovine Serum Albumin)
- **CASA:** számítógép-vezérelt spermavizsgálat (Computer-Assisted Sperm Analysis)
- **DMSO:** dimetil-szulfoxid
- **EG:** etilénlikol
- **FAO:** Az Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezete (Food- and Agriculture Organization of the United Nations)
- **FBS:** magzati borjú szérum (Foetal Bovine Serum)
- **hCG:** humán chorion gonadotropin
- **IUCN:** Természetvédelmi Világszövetség (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources)
- **MeOH:** metanol
- **MS-222:** trikain metán szulfonát
- **MG:** metil-glikol (2-metoxietanol)
- **NE:** nemzetközi egység (IU=International Unit)
- **PG:** propilénlikol (1,2-propándiol)
- **PGC:** primordiális ősvarsejt (Primordial Germ Cell)
- **SSC:** spermatogónium (Spermatogonial Stem Cell)

1. BEVEZETÉS

Napjainkban a génmegőrzés szerepe növekvő fontosságú: évről évre több fajt minősítenek veszélyeztetettnek, kritikus állapotúnak vagy kihaltnak, ezzel párhuzamosan a háziastott fajok genetikai tartalékai a beltenyészetttség következtében folyamatosan szűkülnek. A halak a gerincesek legváltozatosabb és legnagyobb csoportja a maga 32000 – napjainkig – felfedezett fajával. Ennek ellenére a halfajok génmegőrzése erősen elhanyagolt terület (Paxton and Eschmeyer, 2003). A jelenség egyik feltételezett oka, hogy a természetben élő halállományok nem olyan könnyen vizsgálhatóak és hozzáférhetőek, mint a szárazföldön élő állatfajok (Barton, 2007). Az IUCN (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Internet1) 2016-os adatai alapján 5161 vízi faj veszélyeztetett (hal, kagyló, korall fajok), melyből 560 tartozik a sugarasúszójú halak osztályába, 39 a porcos halak osztályába (417 sugarasúszójú és 19 porcos hal faj kritikusan veszélyeztetett). A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) szerint több, mint ezer vízi faj veszélyeztetett a természetes vízi halászat által. Az akvakultúrában tenyésztett halfajok száma folyamatosan növekszik, ez az ágazat látja el fő fehérjeforrással Földünk népességének több, mint 10%-át (FAO, 2012a). Számos faj esetében a természetes populációkból gyűjtik be a tenyészállományt vagy az ivarterméket, ezzel csökkentve a halpopulációk méretét és genetikai diverzitását. Az allélok diverzitásának megőrzésére *in situ* állománymegőrzés mellett ajánlott *ex situ in vitro* génmegőrzést is folytatni, ez az ivarsejtek mélyhűtésével kivitelezhető (FAO, 2012b; Woelders et al., 2012). Ebből a célból génbankok kerültek kialakítására többek között Európában (Ukrajna, Egyesült Királyság, Németország, Csehország, Franciaország), az Amerikai Egyesült Államokban, Brazíliában és Ausztráliában (Martínez-Páramo et al., 2017). A sejtek mélyhűtésével a genetikai információ hosszú távon megőrizhető (Mazur, 1984).

A hal-ivarsejtek mélyhűtése gazdasági és génmegőrzési szempontból egyaránt kiemelt jelentőségű kutatási terület. A halgazdasági termelés során a halsperma mélyhűtése megkönnyíti az ivarsejtek kereskedelmét és szállítását. A kutatás oldalán jelentős szerepe van a mélyhűtési eljárásoknak a génbankok létrehozása során, melyekkel veszélyeztetett fajokat menthetünk meg a kipusztulástól, valamint kiemelt szerepe van a transzgenikus vonalak megőrzésében is. Szintén fontos és fejlődő terület az orvostudományi és fejlődésbiológiai kutatások során használt modellállat, a zebradánió (*Danio rerio*) spermájának mélyhűtése (Cabrita et al., 2010). A laborállatként használt halfajokra - például a zebradánió és a mexikói kardfarkúhal (*Xiphophorus hellerii*) - jellemző a kis testméret, és ennek következményeként a kis mennyiségű sperma

termelése. A néhány µl térfogatú folyadék fagyasztásánál a hagyományos mélyhűtés nehezen kivitelezhető, a vitrifikáció viszont megoldást jelenthet erre a problémára (Schuster et al., 2003). A legtöbb halfaj esetében az általánosan elterjedt spermamélyhűtési eljárás a hagyományos (lassú) fagyasztás (Cabrita et al., 2010), azonban a közelmúltban számos kutató kezdte el vizsgálni a halsperma vitrifikációját, azaz ultragyors mélyhűtését (Abed-Elmdoust et al., 2015; Andreev et al., 2009; Cuevas Uribe, 2011; Cuevas-Urbe et al., 2013; Figueroa et al., 2015, 2013; Merino et al., 2012, 2011; Varela Junior et al., 2015).

Az elmúlt három évtizedben végzett számos kutatás ellenére hal petesejtek (ikra) és embriók mélyhűtése a tudomány jelenlegi állása szerint nem kivitelezhető sem vitrifikációval, sem a hagyományos mélyhűtési eljárásokkal (Bart, 2000; Labbé et al., 2013; Liu et al., 1998; Magyary et al., 1995; Pribenszky et al., 2011; Streit-Jr et al., 2014; Zhang & Rawson, 1996). Ennek alapvető oka az ikra és az embrió viszonylag nagy mérete, magas hűtési érzékenysége, valamint a nagy mennyiségű szikanyag, melybe az alacsony permeabilitású sejtmembránokon nem tud a károsodások megelőzéséhez elegendő védőanyag bejutni (Isayeva et al., 2004; Liu et al., 1998; . Robles et al., 2009a; Zhang & Rawson, 1998). Számos kutatás foglalkozik a probléma megoldásával, többek között a membráncsatornák alaposabb megismerésével és megváltoztatásával (Hagedorn et al., 2002, 1997), valamint a szikanyag részleges eltávolításával (Liu et al., 1999, 2001). Egyre több kutató álláspontja szerint a csírasejtek (Calvi & Maise, 1998; Maise et al., 1998; Tsai & Lin, 2012) és ősvarsejtek mélyhűtése a helyettesítő megoldás (Robles et al., 2009b). Különböző halfajokban sikeresen alkalmaztak vitrifikációt ősvarsejtek mélyhűtésére (Higaki et al., 2013a; Kawakami et al., 2012). Ez az eljárás áttörést jelenthet a hal génmegőrzés területén, mivel az ősvarsejtek (spermatogóniumok, oogóniumok) mélyhűtésével megőrizhető mindkét ivar genomja. Vitrifikált zebradánió embriókból izolált primordiális ősvarsejtek steril recipiensbe történő átültetésével fertilis zebradániókat hoztak létre, melyek a vitrifikált embriók genetikai állományát örökítették tovább (Higaki et al., 2013b, 2010, 2009). Ezek alapján kijelenthető, hogy amennyiben sikerül a génmegőrzés tárgykörében érdekelt (pl. veszélyeztetett) halfajokra primordiális ősvarsejt mélyhűtési módszereket kidolgozni, azzal lehetővé válik az adott faj *ex situ in vitro* génmegőrzése – anélkül, hogy embriót vagy petesejtet tárolnának mélyhűtve.

1.1. Célkitűzések

- Kutatásaim célja fajspecifikus sperma vitrifikációs protokollok kidolgozása volt az alábbi halfajok esetében:
 - lazacfélék (*Salmonidae*): pénzes pér (*Thymallus thymallus*), sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*), márványpisztráng (*Salmo marmoratus*),
 - pontyfélék (*Cyprinidae*): ponty (*Cyprinus carpio*), compó (*Tinca tinca*), zebradánió (*Danio rerio*),
 - sügérfélék (*Percidae*): csapósügér (*Perca fluviatilis*),
 - angolnafélék (*Anguillidae*): európai angolna (*Anguilla anguilla*).
- Kutatásaim eredményességének értékelésére a következő mennyiségi és minőségi paramétereket vizsgáltam a vitrifikált, majd felolvasztott spermán:
 - progresszív motilitás,
 - életképesség (membránintegritás),
 - morfometriai paraméterek,
 - termékenyítő képesség.
- A sperma vitrifikációs kutatásokkal párhuzamosan spermatogonium (hereszövet) vitrifikációs protokollokat is teszteltem zebradánió és ponty fajokban. Ezen protokollok eredményességét tripán-kék membránintegritás festéssel vizsgáltam.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. A halak szaporodásbiológiai sajátosságai

A halak a gerincesek legősibb képviselői, az elmúlt 500 millió év során számos különböző evolúciós stratégiát alakítottak ki. Ennek következtében a fajok változatos szaporodásbiológiai tulajdonságokkal rendelkeznek. A legtöbb hal váltivarú, néhány faj esetében azonban hermafroditizmus figyelhető meg, mely lehet szimultán vagy változó. Utóbbi lehet protandriás, ekkor a hímivarú egyedek alakulnak át nőivarúvá néhány tenyészszeszont követően, ilyen például a barramundi (*Lates calcarifer*), vagy protogyniás, amikor a nőivar alakul át hímivarrá, mint a holdfény ajakoshal (*Thalassoma lunare*) esetében. Néhány faj esetében az egyedfejlődés korai stádiumaiban a környezeti paraméterek változtatásával (hőmérséklet, megvilágítás, szociális tényezők), valamint hormonális kezelésekkel befolyásolható az ivari differenciálódás.

2.1.1. A nőivarú halak szaporodásbiológiai sajátosságai

A nőivarú halak (ikrások) szaporodásbiológiája napjainkban is jelentősen kutatott terület, mivel az oogóniumtól a vízbe leadott ikráig történő fejlődés folyamata igen bonyolult és fajoként változatos mintát mutat (Lubzens et al., 2010). A változatosságot az a tény is jól szemlélteti, hogy ugyan a legtöbb halfaj ovulipar (peterakó), vannak azonban ovipar, azaz termékenyített ikrát lerakó fajok (pl. ráják és cápák tojása), ovovivipar (elevenszülő, amely nem táplálja testen belül a fejlődő utódokat, pl. guppi) és vivipar (elevenszülő) fajok is – ezen csoportok ivarszerveinek felépítése és hormonális szabályozása egymástól jelentősen eltér. A tenyésztett halfajok többsége ovulipar, a nőtények ikrája lehet pelágikus, azaz a vízben lebegő (pl. európai angolna) vagy szubsztratofil, azaz aljzatra vagy növényzetre tapadó (pl. ponty). Az ikra mérete is nagy változatosságot mutat: a pelágikus ikrák többnyire 1 mm körüli átmérővel rendelkeznek, míg a szubsztratofil ikra akár több centiméteres is lehet. A leadott ikra mennyisége is igen változó: a holdhal (*Mola mola*) 28 millió ikraszemet rak le egy tenyészszeszonban, ezzel szemben a hosszúorrú rája (*Raja rhina*) egyetlen ikrát rak le (Paxton & Eschmeyer, 2003). Az ikra fejlődése lehet szinkron (pl. angolnafélék) vagy aszinkron (ebben az esetben a különböző érési stádiumok egy időben jelen vannak a petefészekben, pl. pontyfélék). A szinkron ikratermelés az ikrás egyed ivás utáni elpusztulásával járhat (pl. a csendes-óceáni lazacfajok), ebben az esetben a hal gonadoszomatikus indexe (GSI, az ivarszervek tömegének és a teljes testtömeghez viszonyított százalékos aránya) akár 40%-os is lehet. Utódgondozás a legtöbb faj esetében nincs. Azokban a fajokban, amelyekben megfigyelhető az utódgondozás, különböző stratégiák alakultak ki: az

ivadékrejtő pénzes pér kavicsfészket készít az utódainak, az ivadékörző sügér az aljnövényzetre tapasztja az ikraszalagjait, az ivadékhordozó guppi pedig testében védi a fejlődő embriókat.

Az ikrások petefészke a porcos- és csontos halakban páros szerv, az evolúciósan kevésbé fejlett nyálkahalok esetében páratlan. Az ikra a petevezetőn és az ivarnyíláson áthaladva kerül a külvilágba, azonban néhány esetben nem alakul ki petevezető, így az ikrás a testüregbe ovulál (angolnafélék, pisztrángfélék). Az emlősök petesejtjéhez viszonyítva a halakra nagy mennyiségű szikanyagot tartalmaz, ez a vitellogenezis során épül be a petesejt egyik felébe. A szikkel teli részt nevezik vegetatív pólusnak, míg a sejtmag az érés során a szemközi animális pólusba vándorol. A polispermias megtermékenyülés kizárására több mechanizmus is szolgál: a valódi csontoshalak esetében minden ikrán csak egyetlen csírapapu (micropyle) van, ezen a nyíláson keresztül hatol át a spermium a zona radiata rétegén. A csírapapu belső nyílása alig nagyobb, mint egy spermium feje, így a behatolást követően nincs esély arra, hogy más spermiumok is bejussanak az ikrába (Horváth, 2000). A behatolás és termékenyülés után kialakul az úgynevezett termékenyülési domb, mely kiszorítja a csírapapuból a többi spermiumot, emellett a kortikális granulumból agglutinin áramlik ki, és összetapasztja az ikra közelében lévő spermiumokat (Kiss, 2000).

2.1.2. A hímivarú halak szaporodásbiológiai sajátosságai

2.1.2.1. *A here felépítése és a spermatogenezis folyamata*

A here a petefészkekhez hasonlóan porcos- és csontoshalakban páros szerv, nyálkahalokban páratlan. A legtöbb faj esetében lebenyes (lobuláris) szerkezetű, kevesebb fajnál csöves (tubuláris) szerkezetű. A gazdasági szempontból jelentős halfajokra a lebenyes a jellemző, ebben az esetben a különböző fejlődési stádiumú ivarsejtek a here lumenében mindenhol megtalálhatóak. A spermiumok Sertoli-féle sejtek – melyek az emlősökkel ellentétesen felnőtt egyedekben is osztódnak – közé ágyazva fejlődnek, mely sejtek funkciója a tápanyagtranszport és a spermatogenezis végén visszamaradt spermiumok fagocitózisa. A lebenyek közti térben az emlősök Leydig-sejtjeivel azonos funkciójú intersticiális sejtek találhatóak, melyek különböző szexuáliszteroidokat termelnek (Horváth, 2000). Két heretípust különböztetünk meg: az úgynevezett pisztráng-típus esetében az ivari ciklusok között kizárólag A-típusú spermatogóniumok találhatóak a herében, míg a ponty-típusnál nincs éles átmenet a ciklusok között; több fejlődési stádium is jelen van egyidejűleg a herében.

A primordiális ősvarsejtek már az egyedfejlődés korai szakaszaiban megjelennek. Ez a sejttypus mitotikus osztódásra képes, ezáltal létrehozva az A-típusú spermatogóniumokat, melyek a herében megtalálható legnagyobb méretű sejtek. A nem-differenciálódott A-típusú

spermatogóniumokból alakulnak ki a differenciálódott A-típusú spermatogóniumok. Ezekből a sejtekből keletkeznek a B-típusú spermatogóniumok, melyek az A-típusúakhoz képest kisebb méretűek. A következő lépés a meiotikus osztódások kezdete, mellyel kialakulnak az elsőrendű spermatociták (2n), majd az ezt követő meiózissal a másodrendű spermatociták (n). Utóbbiak differenciálódásával alakulnak ki a spermatidák, majd elongálódás révén az érett spermiumok (Schulz et al., 2010). A spermio-hisztogenezis fajonként igen eltérő lehet, ennek oka a spermiumokra jellemző változatos szerkezet (lásd: 2.1.2.2. fejezet).

2.1.2.2. A spermiumok felépítése

A spermiumok alakja és evolúciós fejlettsége közötti kapcsolatot jól szemlélteti az egyes fajokra jellemző spermiumok alaki és felépítésbeli változatossága, amely nagy diverzitást mutat különböző fajok között – néhány esetben egyes családokon belül is (1. ábra). A spermiumok felépítése taxonómiai besorolások alapja is lehet (Jamieson, 1991). A spermiumok feje lehet kerekded vagy hosszúkas, a farki részhez képest szimmetrikus (pl. pisztrángfélék) vagy aszimmetrikus (pl. sügérfélék). Az emlős spermiumok szerkezetével összehasonlítva az egyik legfontosabb szerkezeti különbség, hogy a hal spermiumoknak nincs akroszómája (ez alól kivételt képeznek az ősi tokalakúak). A feji rész általában körülbelül 2 mikrométeres, ezt követi a középdarab, és az 50-60 mikrométer hosszú flagellum (Mattei, 1991). A spermiumok alakja függ az adott faj evolúciós fejlettségétől, valamint a megtermékenyülés módjától: külső megtermékenyülésű fajok esetén a középdarab rövid, belső megtermékenyülésű fajoknál azonban jól fejlett, sok mitokondriumot tartalmaz. A halspermiumok 7 fő típusa (Mattei, 1991):

-Percomorpha: fejlett spermium forma, a sejtmag elhelyezkedése, alakja, valamint a mitokondriumok száma (1-6) változó. A mitokondrium(ok) a flagellum alapi részénél vannak. Ebbe a csoportba sorolható a csapósügér.

-Atherinomorpha: ebbe a csoportba tartozik a laborállatként is használt medaka (*Oryzias latipes*), a spermiumok feje szimmetrikus, formájuk a csoporton belül változatos.

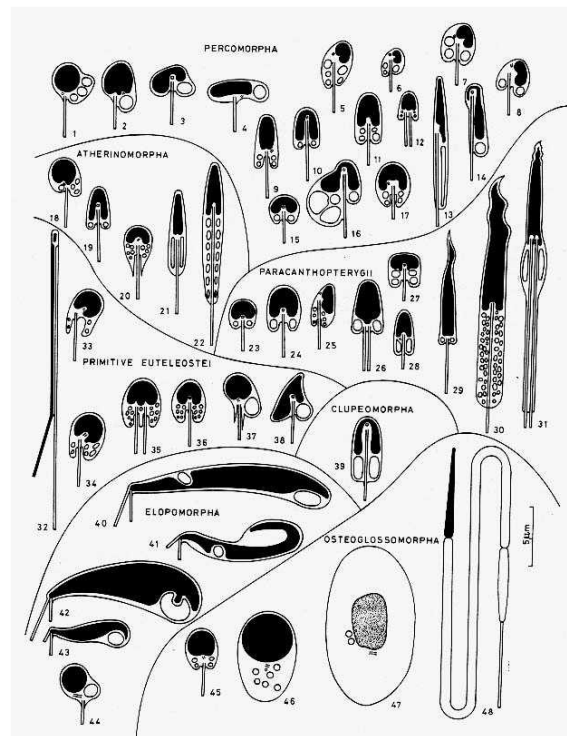
-Paracanthopterygii: ez a típus jellemző többek között a horgászhalalakúakra és a kígyóhalfélélékre. A fej alakja szimmetrikus, kerekdedtől hosszan megnyúltig terjedően változatos.

-Euteleostei: a lazacfélékre jellemző spermium típus, a feji rész aszimmetrikus.

-Clupeomorpha: ez a típus a heringfélélékre jellemző, szimmetrikus feji rész és megnyúlt sejtmag jellemzi.

-Elopomorpha: ez a típus többek között az angolnafélékre jellemző, megnyújt sejttaggal és feji résszel rendelkezik.

-Osteoglossomorpha: az ebbe a típusba tartozó spermiumok további négy további altípusra oszthatóak, ezek egymástól morfológiailag jelentősen eltérnek: van köztük flagellum nélküli, gömb formájú feji résszel rendelkező, és megnyúlt fejű egyaránt. A csoportot képviselő fajok többsége napjainkra kihalt, a ma élő fajok közül az elefánthal (*Gnathonemus petersii*) tartozik ide.



1. ábra: A halspermiumok 7 fő csoportja. (Mattei, 1991)

A spermiumok mozgásának a következő tényezők a feltételei: ép sejtártya (melyen keresztül az extra- és intracelluláris tér között anyagcsere folyik), a mozgáshoz elegendő ATP, a mikrotubuláris rendszer összehúzódása (mely által létrejön a mozgás). A halsperma élettani paramétereit közül kiemelten fontos az oxigén-fogyasztás, melynek értéke fajfüggő; 1-70 nanomol oxigén/perc/ 10^{10} spermium. Emiatt a sperma tárolása és szállítása során a friss oldott oxigént folyamatosan biztosítani kell. Az energiaraktározás módja fajonként eltérő, a guppik esetében a spermiumok glikogént raktároznak (Anderson & Personne, 1970), ám ennél gyakoribb a monoszacharid raktározás (például lazacféléknél). A mozgási energiát a spermium az ATP hidrolízisével nyeri, ennek katalizátor enzime a dínain ATPáz, mely flagelláris mozgást hoz létre. Külső termékenyítésű fajok az endogén energia és tápanyag raktárakat használják fel, belső

termékenyítésű fajok esetén az ovariális folyadékknak van tápláló hatása. A motilitás időtartama fajfüggő, édesvízi fajoknál általában kevesebb, mint 60 másodperc, amit magas sejtszámmal és gyors mozgással kompenzálnak. Tengeri fajok esetében hosszabb az időtartam, a rombuszhal spermája például 8-10 percig is mozog. Számos halfaj spermájának motilitási időtartamát vizsgálták már, az értekezésemben vizsgált fajok spermájának átlagos motilitásának időtartama az alábbiak szerint alakul: ponty: 90" (másodperc), sebes pisztráng: 90", sügér: 10", pér: 31", compó: 54", zebradánió: 60", európai angolna: 75" (Browne et al., 2015). Az ivartermék kinyerésének és tárolásának, valamint az aktiváló oldat összetételének függvényében ezek az értékek a felsoroltaktól eltérhetnek. A motilitás mérése során fontos tisztában lenni az egyes fajokra jellemző tulajdonságokkal, és az aktivációt követően az adott időintervallumon belül elvégezni a méréseket.

A herében immotilisak a spermiumok, mozgásukat a megváltozott környezeti tényezők aktiválják. Ilyen tényezők az ozmolalitás megváltozása (szeminális plazma ozmolalitásához viszonyítva), a kalcium-ion koncentráció változása és a kálium-ion koncentráció. Édesvízi fajok spermiumai izotóniás környezetben mozdulatlanok (~ 300 mosmol kg^{-1}) és hipotóniás környezetben (édesvíz) aktiválódnak (< 300 mosmol kg^{-1}). Tengeri fajok esetében hipertóniás közegben (tengervíz) történik az aktiváció (> 300 mosmol kg^{-1}). Lazacfélék és tokfélék esetében a kálium-ion koncentráció csökkenése váltja ki az aktivációt (Morisawa & Suzuki, 1980). Ebben az esetben a kálium-ion kiáramlást a plazmamembrán hiperpolarizációja, valamint a cAMP szintézis stimulálja, majd cAMP-függő foszforilációt követően kezdődik a mozgás. Az aktivációs mechanizmus a többi édesvízi és tengeri fajnál Ca^{2+} -függő, cAMP független (Krasznai et al., 2000).

2.1.3. A termékenyülés folyamata halaknál

A halak esetében a termékenyülés folyamata lehet külső, illetve belső. Külső termékenyülés esetén a tejes a vízbe leadott ikrát termékenyíti meg, míg belső termékenyülésnél a folyamat a nőivarú egyed hasüregében játszódik le. Az emlősökkel szemben, ahol a mellékhere az a szakasz, ahol a spermiumok elnyerik mozgásképeségüket (de Kretser et al., 1998), a halak esetében a spermiumok aktivációjáért a külső környezet felelős, azaz a sejtek a vízbe kerüléskor kezdik meg mozgásukat (Cosson, 2004; Nóbrega et al., 2009; Schulz et al., 2010). Az emlősöknél lejátszódó megtermékenyüléstől további fontos eltérés, hogy mivel a spermiumok akroszóma hiányában (ezalól kivételt képeznek a tokfélék) nem rendelkeznek enzimatis aktivitással, a zona radiata rétegén a csírapapun keresztül hatolnak át (Horváth, 2000; Jonathan and Niall, 1992).

Az ikra aktiválódása a vízzel való érintkezést követő 20-40 másodpercen belül megtörténik. Az aktiválódást követően az ikra vizet vesz fel, térfogata többszörösére nő, külső rétege megkeményedik (mechanikai védelem) és egyes fajokban ragadóssá válik (baktericid és fungicid hatás, valamint rögzítő funkció). A spermium behatol az ikrába, majd a fej vándorlását követően kialakul a hím előmag, a csírákorong és a termékenyülési domb (utóbbi a spermium behatolásának helyén, a csírapu belső nyílása alatt keletkezik), végül indukálódik az érési osztódás folytatása.

A mesterséges szaporítás során az ivarsejt termelés indukáltan történik: első lépésben a fotoperiódust és a vízhőmérsékletet szabályozzák, majd hormonális készítményekkel (injekció vagy implantátum) szabályozzák az ivarérettséget. A hormonkezelés leggyakrabban hipofízis kivonat vagy hCG oltással történik, de emellett használhatóak LHRH analógok is (dopamin antagonistával kombinálva). A megfelelő érettség – és az ikrások esetében az ovuláció – elérése után az ikrát és a tejet külön-külön fejik le száraz edényekbe, majd az ikrához hozzákeverik a tejet. Ez a folyamat történhet aktiváló oldat hozzáadása előtt („száraz termékenyítés”), vagy oldat hozzáadása után („nedves termékenyítés”), az optimális módszerek és aktiváló oldatok fajonként eltérőek. Az egyes fajokra jellemző természetes termékenyülési módokat, valamint a vizsgált faj szaporodási környezetét (édesvízi vagy tengeri) figyelembe kell venni a mélyhűtés során az optimális összetételű immobilizáló hígító oldatok, valamint a motilitásvizsgálat és termékenyítés során használt aktiváló oldat megválasztásakor.

2.2 Spermaminősítési módszerek

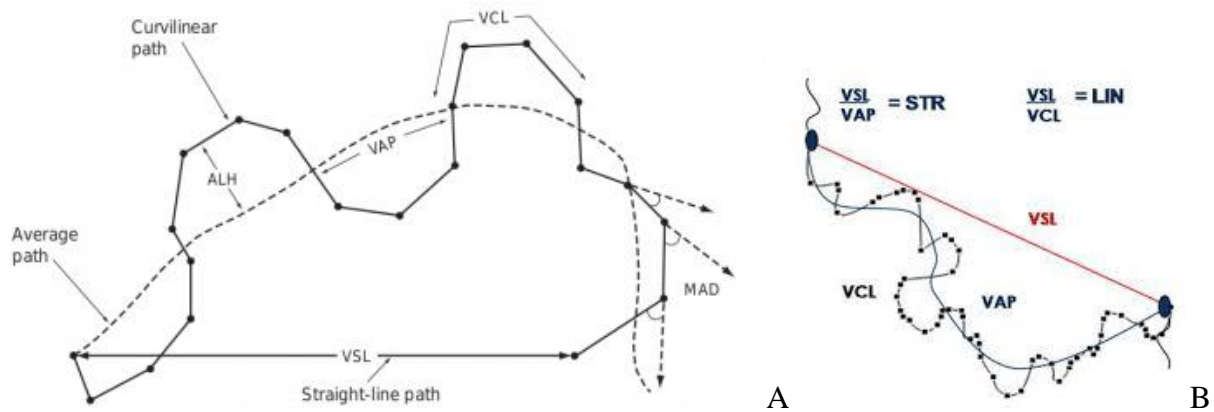
2.2.1. A spermiumok motilitásának objektív mérése a CASA rendszerrel

A spermiumok mozgása mérhető fénymikroszkópos vizsgálatot követő becsléssel, azonban ennél sokkal precízebb és objektívebb eredmények kaphatók CASA rendszer használatával (Fauvel et al., 2010; Kime et al., 2001). A számítógép-vezérelt spermavizsgáló berendezések létrejötte előtt a következő spermavizsgálati módszereket alkalmazták (időrendi sorrendben): fénymikroszkóp, multiexpozíciós fényképezés, videofelvételek, spektrofotométerek (Horváth et al., 2006a). A CASA rendszer több mozgási paraméter (1. táblázat, 2. ábra) értékét rögzíti (WHO, 2010), amelyeket a következő módon mér: videofelvételt készít a mozgó spermiumokról, majd az egyes spermiumok fejének elmozdulásának útvonalát követi végig. A rendszert humán klinikákra érkező spermaminták minőségének objektív elbírálására dolgozták ki az 1980-as évek közepén, majd a '90-es években elsőként Kínában terjedt el a klinikai alkalmazásban (Lu et al., 2014). Ezzel egy időben különböző halfajok spermáján is megkezdték a CASA vizsgálatokat, többek között spermán végzett toxikológiai tesztekkel (Kime et al., 1996). Az elmúlt közel negyven év során a

szoftverrendszerek komoly fejlődésen mentek keresztül, és napjainkban is folyik a fejlesztésük a hordozhatóság és az egyszerű kezelhetőség terén (Amann & Waberski, 2014). A humán spermavizsgálatok után egyre szélesebb skálán dolgoztak ki vizsgálati protokollokat, elsősorban gazdasági haszonállatok spermájának minősítésére (szarvasmarha, ló, nyúl), de léteznek kimondottan halsperma vizsgálatát célzó fejlesztések is (Kime et al., 2001; Wilson-Leedy & Ingermann, 2007). CASA rendszerek fejlesztésével és gyártásával számos cég foglalkozik, például a spanyol Microptic S.L. és Proiser R+D, S.L. cégek, a francia IMV Technologies, az egyesült államokbeli Hamilton-Thorne, valamint a németországi székhelyű Minitube.

1. Táblázat. A hímivarsejtek mozgását jellemző mért és számított értékek. (Horváth et al., 2006a)

Jelölés	Mozgási paraméter	Mértékegység
Mot	Motilitás	%
Pmot	Progresszív motilitás	%
VCL	Sebesség a teljes megtett útvonalra számolva	$\mu\text{m/s}$
VSL	Sebesség a kiindulási és végpont közötti távolságra számolva	$\mu\text{m/s}$
LIN	Az útvonal egyenestől számított eltérése	%
VAP	Sebesség átlagolt útvonalra számolva	$\mu\text{m/s}$
ALH	A fej oldalirányú kitéréseinek átlagos nagysága	μm
BCF	A fej kilengésének frekvenciája	Hz
DAP	Ténylegesen megtett út és a kiindulási- és végpontok közti távolság átlagolt hossza	μm
DCL	Ténylegesen megtett út hosszúsága	μm
DSL	Megtett egyenes útvonal a mozgás kiindulási- és végpontja között	μm
WOB	Teljes mozgási útvonal átlagolt mozgási útvonaltól számított eltérése	%
STR	Átlagolt mozgási útvonal egyenestől számított eltérése	%

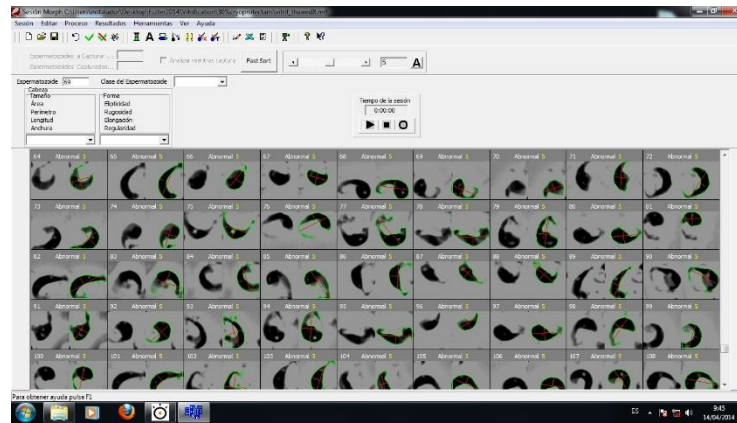


2. ábra: A CASA által mért mozgási paraméterek (A, forrás: WHO, 2010) és a különböző mért paraméterek összefüggése (B, forrás: Internet2)

A CASA rendszer használatakor a halspermát aktiváló oldattal keverjük össze spermavizsgáló kamrában [például: Makler-kamra, (Makler, 1978)], ezután a mintát a mikroszkóp objektíve alá helyezzük, és a szoftverrel több látótérrel készítünk felvételeket. Az aktivációt érdemes legalább egyszer megismételni, hogy minél objektívebb információt kapjunk a sperma motilitásáról.

2.2.2. A spermiumok morfológiájának szoftveres elemzése

Számos faj esetében az ideális kísérleti végpont a termékenyítési teszt, azonban az angolna speciális szaporodásbiológiai sajátosságai (főképp az ovuláció időzítetősége körüli problémák) miatt termékenyítési vizsgálat nehezen kivitelezhető. A spermiumok egyes morfológiái paraméterei összefüggésben állnak a termékenyülési paraméterekkel (Rurangwa et al., 2004, Yániz et al., 2015), ezért ezt a módszert választottam az angolna esetében, hogy további információkhoz jussak a vitrifikációs protokollok ivarsejtekre gyakorolt hatásáról. Az ASMA-val (számítógép-vezérelt spermium-fej morfológiái vizsgálat, Computer Automated Sperm head Morphometry Analysis, 3. ábra) vizsgálták már többek között nyúl (Gravance & Davis, 1995), kecske (Hidalgo & Dorado, 2009), bika (Amann & Waberski, 2014; Gravance et al., 1996), kos (Gravance et al., 1998), kan (Peña et al., 2005), aranyhal (Van Look and Kime, 2003), angolna (Marco-Jiménez et al., 2006b) és humán (Bellastella et al., 2010) spermiumok morfológiái paramétereit is.

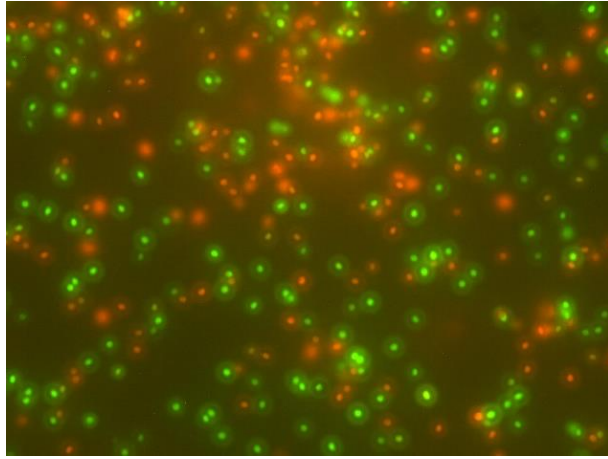


3. ábra: A sperma morfometriájának vizsgálatára használt szoftver kezelőfelülete európai angolna spermiumainak vizsgálatakor

2.2.3. Membránintegritás vizsgálat

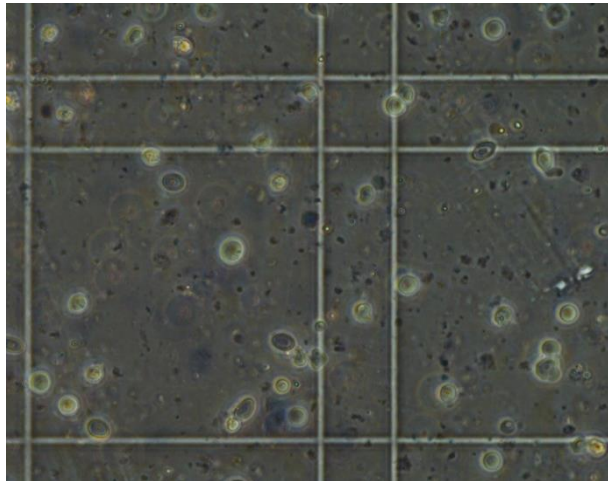
A membránintegritás vizsgálatokat gyakran használják a mélyhűtött sperma életképességének megítélésére (Graham & Mocé, 2005). A halak és más vízi élőlények spermájának mélyhűtés utáni életképesség vizsgálatára az 1960-as évek óta (Fribourgh, 1966) több protokollt is kidolgoztak, ezek jelentős része a SYBR-14/PI (propídium-jodid) festésen alapul (Cabrita et al., 2005; Garner et al., 1994; Paniagua-Chavez et al., 2006). A SYBR-14 az élő sejtek membránján áthatolva a sejtmag DNS-éhez kötődik, a propídium-jodid a sérült membránú (elhalt) spermiumok maganyagát festi meg (Segovia et al., 2000, 4. ábra).

A spermiumok SYBR/PI festettsége vizsgálható áramlási citometriával (flow citometria) is (Garner et al., 1994; Martínez-Pastor et al., 2010). Az áramlási citometria precíz, érzékeny, megbízható és gyors módszer a sejtek vizsgálatára. A membránintegritás vizsgálatok mellett áramlási citometria használatával vizsgálták már a vitrifikált halsperma más minőségi paramétereit is, többek között a DNS töredezettségét és mitokondriális aktivitást (Isachenko et al., 2004). Szarvasmarha fajban több különböző festék használatával vizsgálták a plazma- és akroszómamembrán épségét (Nagy et al., 2004, 2003) is áramlási citometriával. A módszer további előnye, hogy a hagyományos mikroszkópos számolási eljárásoknál objektívebb eredményt ad, és azonos időintervallum alatt nagyságrendileg több sejtet képes leszámolni.



4. ábra: SYBR/PI festett sügér spermiumok vitrifikációt követő felolvasztás után

Egy másik membrán-festéses eljárás során tripán-kék festést használnak (Strober, 2001), ez a festék a propidium-jodidhoz hasonlóan a sérült membránon hatol át, így az elpusztult sejteket festi kékre. Ez az eljárás jól használható a spermatogóniumok túlélésének vizsgálatára, mivel a szövet emésztését követően maradhatnak az oldatban sejt-törmelékek és spermiumok, amelyeket a fluoreszcens festékek ugyanúgy megfestenek, mint a spermatogóniumokat. A spermatogóniumok fenotípusos megkülönböztetéséhez fénymikroszkóp jól használható, így a fluoreszcens festésnél sokkal könnyebben kivitelezhető a spermatogóniumok membránintegritás vizsgálata tripánkék festéssel (5. ábra).



5. ábra: Zebradanió spermatogóniumok tripánkék festést követően, Bürker-kamrában

2.2.4. Termékenyítési tesztek

Azon fajok esetében, ahol rendelkezésre áll szaporítható ikrás állomány, termékenyítési tesztek nyújtják a legmegbízhatóbb információt az alkalmazott vitrifikációs protokoll eredményességéről. A termékenyítési tesztek megtervezésekor figyelembe kell venni a vizsgált faj

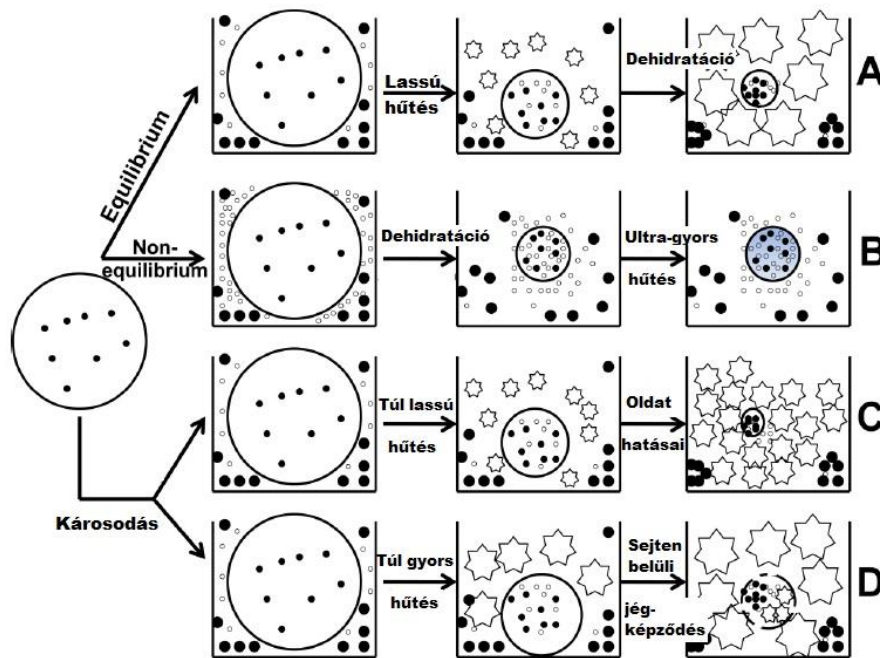
biológiai sajátosságait, többek között a spermiumok mozgásának idejét és az ikra sajátosságait (tárolhatóság, termékenyítés módja). A termékenyítési teszteknel különböző végpontokat mérhetünk, például termékenyülési százalékot, szempontos stádiumig fejlődő embriók arányát, kelési százalékot.

2.2. Spermamélyhűtési eljárások

A sejtek, szövetek és szervek hosszú távú tárolását és felhasználási lehetőségét teszik lehetővé a különböző mélyhűtési eljárások, melyek után a mélyhűtött anyagot cseppfolyós nitrogénben (-196°C), vagy -80°C -os fagyasztóban tároljuk. Ezen a hőmérsékleten jelentősen korlátozottak azok a fizikai és kémiai reakciók, melyek során csökkenhetne a minta minősége.

Az első sikeres spermamélyhűtést Polge és kutatócsoportja dolgozta ki 1949-ben, ekkor fedezték fel a glicerin krioprotektív hatását humán és baromfisperma mélyhűtésekor (Polge et al., 1949). A halsperma mélyhűtési módszerek tökéletesítésén 1953 óta dolgoznak a kutatók (Blaxter, 1953), a többi gazdasági haszonállathoz hasonló időben kezdték a vizsgálatokat. Ennek ellenére a halsperma mélyhűtése a halgazdasági termelésben nem terjedt el, ennek egyik oka az, hogy halfajonként különbözőek az optimális mélyhűtési módszerek. A jelenség másik oka az, hogy az emlősökkel összehasonlítva a halak egyedi tenyésztési értéke lényegesen kisebb, mint egy nagy gazdasági értékű tenyész bikáé – a szarvasmarhatenyésztésben átlagosan évi 250 millió műszalmányi spermát mélyhűtenek kereskedelmi célból (FAO, 2012b).

A mélyhűtés során alkalmazott ekvibrációs idő és hűtési sebesség alapján megkülönböztetünk lassú/ekvilibrium (hagyományos mélyhűtés), valamint ultragyors/non-ekvilibrium (vitifikáció) hűtési eljárásokat (6. ábra). A két mélyhűtési módszer különböző sejtkárosodásokkal járhat, ebből adódóan sejtípusonként eltérő, hogy melyik eljárás terjedt el a gyakorlati alkalmazásban. A spermamélyhűtés céljából a gyakorlati felhasználás során (hal, humán, szarvasmarha fajok esetében) a lassú mélyhűtési módszerek terjedtek el, ezzel szemben embriók és petesejtek tárolására a vitifikációs eljárásokat részesítik előnyben.



6. ábra: Az ekvilibrum és non-ekvilibrum hűtések során fellépő károsodások. (Cuevas-Urbe, 2011 nyomán)

A) Az ekvilibrum hűtés során alacsony koncentrációban védőanyagokat és lassú hűtési sebességet használunk. A membrán-permeábilis védőanyagok (átlátszó körök) csökkentik az oldat fagyáspontját, ezáltal megnövelik a dehidratációhoz rendelkezésre álló időt. A nem-permeábilis védőanyagok (fekete körök) elősegítik a sejtek dehidratálódását, valamint stabilizálják a sejtek membránjait a mélyhűtés során. Az első jégkristályok keletkezésekor (csillagok) létrejövő hipertóniás környezet ozmotikus dehidratációhoz vezet.

B) A non-ekvilibrum vitrifikáció során magas koncentrációban használunk védőanyagokat a sejtek gyors dehidratálása érdekében. A védőanyagok kiszorítják és helyettesítik a sejten belüli vizet a hűtés kezdete előtt. Az ultragyors mélyhűtés során a sejteken belüli és sejteken kívüli jégkristályok képződése egyaránt gátolt. A vitrifikáció eredményeképp üvegszerűen áttetsző, amorf-szilárd anyag képződik a folyadékból.

A mélyhűtés során fellépő károsodások két fő eredete:

- C) Oldat hatása (ozmotikus stressz), melynek révén a hosszú időn át fenntartott magas ozmolalitás károsítja a sejteket, valamint a fehérjék denaturálódhatnak.
- D) Sejten belüli jégképződés: a gyors hűtés során a sejteknek nem áll rendelkezésükre elegendő idő a teljes dehidratálódáshoz, így intracellulárisan jégkristályok képződhetnek, melyek a sejteket szerkezeti és funkcionális is károsítják.

A mélyhűtési eljárások során használt védőanyagok lehetnek membrán-permeábilisak vagy más néven intracellulárisak, vagy nem membrán-permeábilisak avagy extracellulárisak. A sperma mélyhűtése során leggyakrabban használt intracelluláris védőanyagok a következők: metanol, dimetil-szulfoxid, glicerín. Extracelluláris védőanyagként cukrokat (szacharóz, glükóz, trehalóz), fehérjéket (BSA, FBS, szemínális plazma) és polioloikat (polietilén-glikol) használnak. A sikeres mélyhűtés egyik kulcsfontosságú tényezője a megfelelő védőanyag, illetve védőanyag-kombináció megválasztása, mivel ezen anyagok magas koncentrációban ozmotikus- és citotoxikus hatásuk révén károsíthatják a sejteket (Gilmore et al., 1997). A vitrifikációhoz szükséges egyes

védőanyagok effektív koncentrációja csökkenthető többek között a nem-permeábilis védőanyagok használatával, megfelelő védőanyag-kombinációkkal (Weiss et al., 2010), valamint az expozíciós idő minimalizálásával (Fahy et al., 1984).

Néhány növény és halfaj természetes körülmények között szintetizál fagyásgátló fehérjéket, melyek használatával a mélyhűtési eljárások során csökkenthető a szükséges membrán-permeábilis védőanyag mennyisége (Fahy et al., 2004). Vágótok sperma vitrifikációjakor halból izolált fagyásgátló fehérje (AFP) megfelelő koncentrációban történő alkalmazásával szignifikánsan jobb motilitás értékeket mértek (Abed-Elmdoust et al., 2015), azonban ez a hatás erős dózis-függést mutat: míg 10 μM AFP alkalmazásával javultak a motilitás értékek, 5 μM és 15 μM AFP kiegészítés nem tért el az AFP-mentes kezelési csoport értékeitől.

2.2.1. Lassú hűtés

A biológiai minták lassú hűtésére számos módszer áll rendelkezésre, amelyek pontosság, megismételhetőség, hordozhatóság, valamint költségvonzat tekintetében jelentősen eltérnek egymástól. Az ekvilibrium hűtés során kulcsfontosságú az optimális hűtési sebesség használata, mivel ellenkező esetben a sejtek károsodnak - túl lassú hűtés során az oldat ozmotikus hatása révén, a túl gyors (de a vitrifikációnál lassabb) hűtés során pedig a sejten belüli jégkristály képződés miatt [„két-faktor hipotézis”, (Mazur et al., 1972)]. A leggyakrabban használt három lassú hűtési eljárást az alábbiakban ismertetem.

2.2.1.1. Nitrogéngőzben végzett hűtés polisztirol dobozban

Számos módszert dolgoztak ki halsperma mélyhűtésére, ezek többsége cseppfolyós nitrogén gőzében végzett lassú hűtést ír le. A módszer problémája, hogy a hűtés során használt polisztirol doboz mérete változó, így nem nevezhetők szabványosnak a leírt protokollok. Előnye, hogy kis infrastruktúra-igényű és könnyen hordozható.

2.2.1.2. Programozható hűtőberendezés

A fenti eljárásnál szabványosabb, könnyen kezelhető, jól ismételtető módszer, emellett bizonyos típusok használatával akár nagy mennyiségű minta (több száz műszalma vagy kriocső) is hűthető egyidejűleg. A programozható hűtőberendezés egy számítógép-vezérelt kamrából és egy nitrogéntartályból áll. A módszer előnye, hogy a hűtési görbe programozható, a tényleges hűtés üteme rögzíthető, így pontos információ áll rendelkezésünkre a hűtés körülményeiről. A programozható hűtőberendezéssel a mélyhűtési folyamat azonos körülmények között megismételhető. A cseppfolyós nitrogén kamrába juttatásával a számítógép szabályozza a hűtés

ütemét. A módszer hátránya a berendezés magas ára, valamint az, hogy mérete (és elektromosság igénye) miatt terepen végzett munka során nem alkalmazható.

2.2.1.3. Fagyasztó dobozok

A programozható hűtés egy másik lehetősége a fagyasztó dobozok használata (pl. CoolCell® kriocsővekhez, BioCision, U.S.A., vagy Mr. Frosty, Nalgene®, 3,6 ml-es csővekhez) melyek használatával a hűtés pontosan 1°C/perc sebességgel megy végbe. A minták elhelyezése után a fagyasztó dobozt -80°C-os hűtőszekrénybe kell tenni. A meghatározott hűtési idő elteltével a minták áthelyezhetők folyékony nitrogénes tartályba. A hűtődobozok hűtési sebességét a gyártók garantálják.

2.2.2. Vitrifikáció

A vitrifikáció non-ekvilibrum hűtés, melynek során ultragyors hűtési [10^6 - 10^{10} °C/másodperc (Franks, 1982)] és felolvasztási sebességeket használnak. A gyors hűtéssel, valamint a többnyire magas védőanyag koncentráció alkalmazásával megelőzhető a jégkristályok kialakulása. A hűtés magas sebessége kiemelten fontos -5°C és -40°C közötti hőmérsékleten, ugyanis ebben a tartományban képződik a jégkristályok jelentős része (Shaw & Jones, 2003). Az oldatot közvetlenül cseppfolyós nitrogénbe helyezzük, az így elért gyors hűlési sebesség miatt a vízmolekulák kristályrácsba rendeződése nem jön létre, és egy üvegszerű, amorf szilárd anyagot kapunk eredményül (Kuleshova et al., 2007). Az így létrejött anyag a folyadékokra jellemző random molekula elrendeződést megtartja a megszilárdulás során (Taylor et al., 2009).

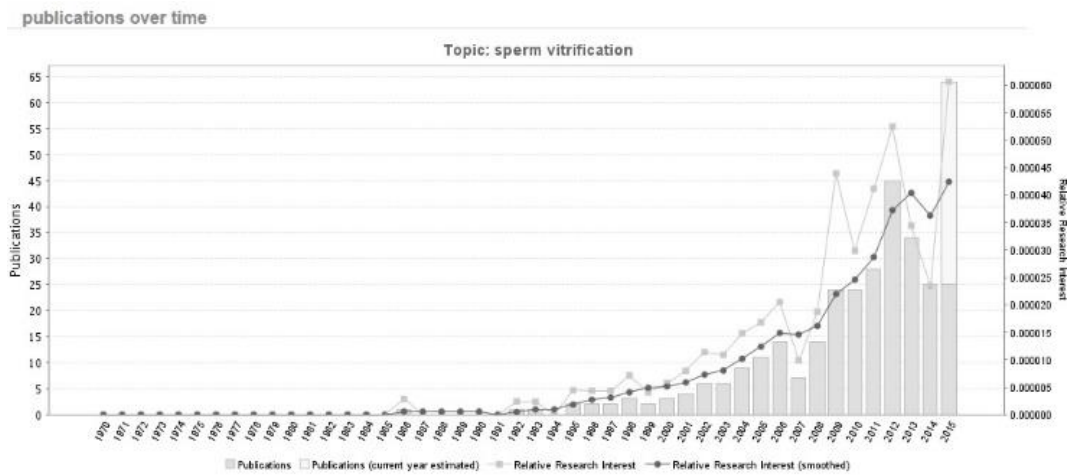
A vitrifikációhoz szükséges magas, 30-50%-os védőanyag koncentráció csökkenti az oldat fagyáspontját, de toxikus hatással lehet a sejtekre (Fahy, 1986). A védőanyag típusától függően lehet közvetlenül toxikus a sejtre nézve, mint a metanol (MeOH), vagy károsíthat az ozmotikus hatása révén, mint a dimetil-szulfoxid (DMSO). Ez a toxicitás az oka annak, hogy számos előnye ellenére a vitrifikáció nem terjedt el a spermamélyhűtés gyakorlatában. További nehézséget okoz, hogy a vitrifikált mintákat folyamatosan alacsony hőmérsékleten kell tartani, ugyanis a devitifikáció, azaz az olvadás során képződő jégkristályok (rekrisztallizáció) éppúgy károsíthatják a sejteket, mint a hagyományos mélyhűtési folyamat során (Fahy et al., 1987). A védőanyag megválasztásakor figyelembe kell venni, hogy a különböző krioprotektánsok nem egyformán hatékonyak a vitrifikáció során, és a toxicitásuk, valamint ozmotikus hatásuk is eltérő lehet (Pegg, 2005).

Az eredményes vitrifikációs eljárásához a védőanyag-koncentrációt a minimálisan szükségesre kell csökkenteni, és a lehető leggyorsabb hűtési sebességet kell használni. A hűtés sebessége és a szükséges védőanyag koncentráció között fordított arányosság van: minél gyorsabban történik meg a vitrifikáció, annál kevesebb védőanyag szükséges a folyamathoz (Mazur et al., 2008). A gyors hőátadást a hűtőeszköz anyaga és töltési kapacitása teszi lehetővé, így érhető el a kristályos jég képződése nélküli fagyás (Tsai et al., 2015).

Az elmúlt évtizedekben megjelent publikációk száma a „vitrifikáció” és a „sperma vitrifikáció” témákban növekvő tendenciát mutat (7. ábra), 1990 óta évente megkétszereződik a publikált kutatások száma ezen a területen (Fahy & Rall, 2007). A módszer előnye a hagyományos mélyhűtéssel szemben, hogy nem igényel speciális hűtőberendezéseket, emiatt egyre inkább előtérbe kerül (Vajta & Nagy, 2006; Vajta et al., 2009). A gyakorlati alkalmazásban elsősorban emlős embriók (Balaban et al., 2008; Rall, 1987; Van Landuyt et al., 2011) és petesejtek (Egerszegi et al., 2013; Smith et al., 2011; Somfai et al., 2010; Zhang et al., 2012) mélyhűtésénél terjedtek el a vitrifikációs módszerek. A humán embriológiai klinikákon történő mélyhűtéses eljárások során különösen magas arányban használnak vitrifikációt, mivel petesejtek és embriók esetében kevesebb károsodást eredményez ez az eljárás, mint a hagyományos mélyhűtés. Humán spermamintákat többnyire ekvilibrium hűtéssel tárolnak, de a vitrifikációt is használják bizonyos esetekben, többek között ha a donor egészségügyi problémák miatt nagyon alacsony spermiumszámmal rendelkezik (Endo et al., 2012; Schuster et al., 2003). A humán klinikák előnyben részesítik a vitrifikációt a hagyományos hűtéssel szemben, mivel számos védőanyag-mentes vitrifikációs protokoll létezik, melyekkel a krioprotektánsok citotoxikus hatásai kiküszöbölhetőek (E. Isachenko et al., 2004).

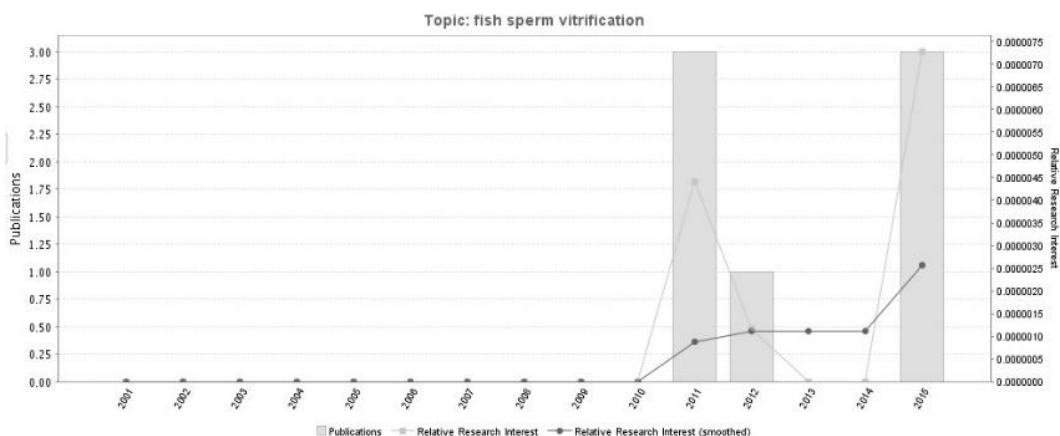
Az első eredményes sperma vitrifikációs protokollt 1938-ban írták le: béka spermát vitrifikáltak szacharóz kiegészítéssel (Luyet & Hodapp, 1938). Miután Polge és munkatársai 1949-ben felfedezték a glicerin védőhatását lassú hűtési sebesség használatakor (Polge et al., 1949), a vitrifikáció tárgykörében csökkent a megjelenő publikációk száma, és helyét átvette az ekvilibrium hűtés. A vitrifikáció az 1980-as évektől kezdett újra megjeleni a kutatásokban, miután sikeresen vitrifikáltak egér embriókat (Rall, 1987). Az ekkoriban vitrifikáció során használt magas (30-40%) védőanyag koncentrációt túlságosan toxikusnak vélték spermiumok hűtésére, ezért egészen a 2000-es évekig nem nőtt a terület kutatottsága. Az áttörést 2002-ben humán sperma védőanyagmentes vitrifikációjával érték el (Nawroth et al., 2002). Ekkor fedezték fel a kis térfogatú folyadék vitrifikációjának kivitelezhetőségét: ebben az esetben oltókacson hűtöttek 20 µl térfogatú mintákat. Ezután számos kutató kezdett humán és szarvasmarha sperma

vitifikációjával foglalkozni, védőanyagmentesen vagy csökkentett védőanyag koncentrációval (Desai et al., 2004; Isachenko et al., 2004; Schuster et al., 2003).



7. ábra: A sperma vitrifikáció tudományterület kutatottsága az utóbbi évtizedekben. Forrás: Internet3

A sperma vitrifikációs eljárások növekvő kutatottsága (7. ábra) ellenére a halsperma vitrifikációja kevésbé vizsgált terület, 2009-ben jelent meg az első cikk a témában, ezt követte még néhány az utóbbi évtizedben (8. ábra), de napjainkban világszerte csak néhány kutatócsoport foglalkozik a témával.



8. ábra: A halsperma vitrifikáció tudományterület kutatottsága. Forrás: Internet4

A halsperma vitrifikáció témakörében a különböző szerzők sok ponton eltérő protokollokat írtak le: az alkalmazott hűtési térfogat: 10-250 μ l között változott, a védőanyag koncentráció: 0-40% között volt. A leírt eredmények hatásfoka szintén igen eltérő, a szerzők 0-44%-os felolvasztás után mért motilitás értékekről számoltak be (2. táblázat). A halsperma vitrifikációjának kiemelt jelentősége van a kis testméretű laboratóriumi modell fajok ivartermékének megőrzésében (Tiersch et al., 2012), mivel a halaktól kinyerhető korlátozott sperma mennyiség a hagyományos eljárásokkal (műszalmás hűtés) egyedenként nem mélyhűthető.

Az irodalmi adatok alapján a tengeri halfajok spermája jobban tolerálja a hűtés során alkalmazott magas védőanyag koncentrációt, mint az édesvízi halak hímivarsejtjei (Drokin et al., 1998; Kopeika et al., 2007; Suquet et al., 2000). Feltételezik, hogy a tengeri és az édesvízi fajok sperma membránja különböző szerkezetű, a tengeri fajok spermiumai ugyanis adaptálódtak a környezet magas ozmotikus nyomásához. Ez a jelenség lehet az alapja a tengeri halfajok spermájára kidolgozott, magas védőanyag koncentrációt használó eredményes vitrifikációs eljárásoknak (Cuevas-Uribe et al., 2013). Az édesvízi halak hímivarsejtjei a mélyhűtést követően jellemzően 40-90%-os arányban károsodnak, míg a tengeri fajoknál ugyanez az arány csak 10-20%-os (Kopeika et al., 2007). Az első sikeres halsperma mélyhűtési protokollokat tengeri fajokra dolgozták ki (Blaxter, 1955, 1953), ezeket követően sikerült csak édesvízi halfajok spermáját is sikeresen mélyhűteni. A vizsgálatok során nehézséget okozhat az egyedek eltérő kriorezisztenciája; azaz a mélyhűtéssel szembeni ellenálló képessége (Babiak et al., 1997).

2. Táblázat. Különböző szerzők által publikált vitrifikációs protokollok főbb jellemzői.

Faj	Védőanyag	Eszköz	Szerző
<i>Oncorhynchus mykiss</i> , <i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	10% DMSO	Üveg sejt 0,1 mm	Andreev et al, 2009
<i>Ictalurus punctatus</i>	20% MeOH + 10% MG + 10% PG	Oltókacs 10 µl	Cuevas-Uribe et al, 2011a
<i>Xiphophorus hellerii</i>	20% glicerin + 20% EG	Oltókacs 10 µl	Cuevas-Uribe et al, 2011b
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	0% (védőanyag mentes)	Mikrocsepp 20 µl	Merino et al, 2011
<i>Cynoscion nebulosus</i> , <i>Lutjanus campechanus</i> , <i>Sciaenops ocellatus</i>	15% EG + 15% DMSO + 10% glicerin	Oltókacs 10 µl	Cuevas-Uribe, 2013
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	10% DMSO	Mikrocsepp 30 µl	Figueroa, 2013
<i>Salmo salar</i>	10% DMSO	Mikrocsepp 30 µl	Figueroa, 2015
<i>Colossoma macropomum</i>	10% DMSO	Műszalma 0,25 ml	Varela Junior, 20
<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	0% (védőanyag mentes, AFP kiegészítéssel)	Mikrocsepp 50 µl	(Abed-Elmdoust et al., 2015)

A gyakorlatban alkalmazott vitrifikációs eljárások során magas koncentrációban használnak védőanyagokat, amelyek közvetetten vagy közvetlenül károsíthatják a spermiumokat. A közelmúltban a csatornaharcsa (*Ictalurus punctatus*) sperma vitrifikációja során közel 25%-os termékenyülést értek el a következő védőanyag összetétellel: 20% MeOH + 20% metil-glikol (MG) + 10% propilénglikol (PG) (Cuevas-Uribe et al., 2011a). Mexikói kardfarkúhal (*Xiphophorus hellerii*) 20% glicerin + 20% etilénglikol (EG) használatával vitrifikált spermájával termékenyített nőtények életképes lárváknak adtak életet (Cuevas-Uribe et al., 2011b). Ezen eredményeket alapul véve kijelenthető, hogy a halak spermiumai jól tolerálják a magas védőanyag koncentrációt, ha az a különböző krioprotektánsok megfelelő kombinációjából tevődik össze.

A védőanyag alkalmazása nélküli vitrifikációs eljárások alapja, hogy növelik az oldat viszkozitását. Halfajok esetében különböző fehérjék, például BSA (szarvasmarha szérum albumin) vagy szeminális plazma felhasználásával érik ezt el. Ezzel a módszerrel vitrifikált szivárványos pisztráng (*Oncorhynchus mykiss*) sperma esetében kiemelkedően magas (80% körüli) felolvasztást követő motilitás- és membránintegritás értékeket mértek (Merino et al., 2012, 2011), azonban

ebben az esetben a mikrocsepp viszonylagosan nagy mérete miatt feltehetően nem történt tényleges vitrifikáció, csak egy gyors hűtés.

2.3. Spermátogónium- és primordiális őssejt-mélyhűtési eljárások

Halak esetében a nagy mennyiségű felhalmozott szikanyag miatt a petesejt (ikra) és embrió mélyhűtése nem kivitelezhető (Chao & Liao, 2001; Gwo et al., 2009; Isayeva et al., 2004; Streit-Jr et al., 2014), ennek hiányában kizárólag a mélyhűtött spermából nem reprodukálható az adott faj, így a veszélyeztetett fajok *ex situ in vitro* génmegőrzése nem megoldott. Erre a problémára megoldás lehet a hereszövetből izolált spermátogoniális őssejtek (spermátogóniumok) mélyhűtése, melyek steril (pl. triploid) recipiensbe ültetve a recipiens ivarától függően képesek mindkét ivar irányába differenciálódni (Lacerda et al., 2013; Robles et al., 2016; Yoshizaki et al., 2011, 2003), így a recipiens egyed a donor faj spermáját vagy ikráját termeli. Ezzel a módszerrel áthidalható az ikramélyhűtés problémája, és a mélyhűtött spermátogóniumok beültetésével akár teljes kipusztulás után is reprodukálható lenne egy adott faj. Azokban a fajokban, ahol az ivar genetikailag determinált, a cél a heterogametikus ivar megőrzése, ugyanis ebben az esetben nem veszik el genetikai információ. Ez azt jelenti, hogy XX/XY rendszer esetében a spermátogóniumokat, míg ZZ/ZW rendszer esetében az oogóniumokat célszerű megőrizni.

A spermátogóniumok és primordiális őssejtek mélyhűtése történhet izolált sejtek vagy egész szövetek formájában (Wang et al., 2008; Xiao et al., 2010), de akár egész embrió (Higaki et al., 2013a) mélyhűtését követően is izolálhatók ezek a sejtípusok. Az izolált spermátogóniumokat lárvakorban hasüregbe injektálva a donor eredetű sejtek kolonizálják a recipiens ivarszervét, melyet fluoreszcens jelöléssel nyomon követhetünk (Okutsu et al., 2006; Yoshizaki et al., 2010).

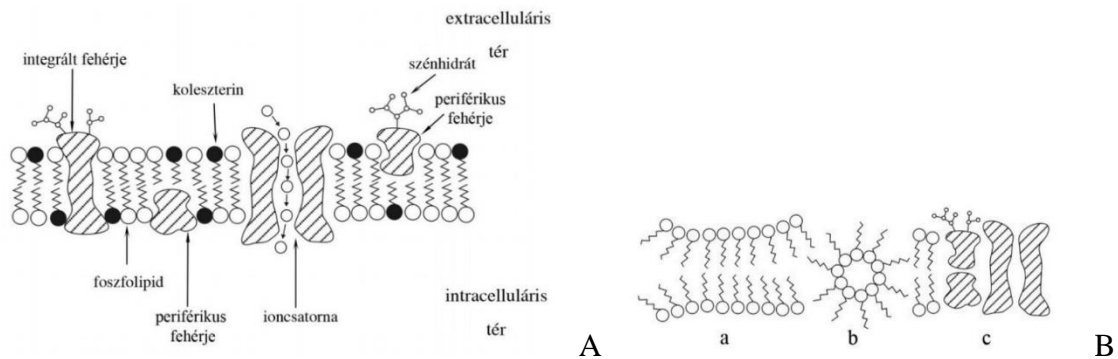
2.4. Az intracelluláris védőanyag-koncentráció csökkentésének lehetőségei

Az intracelluláris védőanyagként használt alkoholok citotoxicitása miatt a felhasznált koncentrációt a minimálisan elégséges szintre szükséges csökkenteni. A membrán-permeabilis védőanyagok kedvező hatása részben kiváltható extracelluláris védőanyagokkal.

2.4.1. Fehérje kiegészítés

A mélyhűtési eljárások során a növekvő ozmolalitás és csökkenő hőmérséklet hatására a sejthártya fehérjei aggregálódhatnak, valamint a sejthártya instabillá válhat (a lipidmolekulák

hexagonális-II elrendeződésbe kerülése miatt). Egyes foszfolipidek nem képesek a felolvasztás során visszaalakuló kettős lipidmembránban visszaszerezni eredeti elrendeződésüket (9/A ábra), így a károsodás irreverzibilis (9/B ábra). Ezen folyamatok (a fehérjék összecsapódása, a lipidek rendellenes elrendeződése és a membránszivárgások) visszaszorítása megoldást jelenthet a sejthártya stabilizálására, ez különböző típusú fehérjék hígítóhoz való hozzáadásával érhető el. (Horváth et al., 2006b)



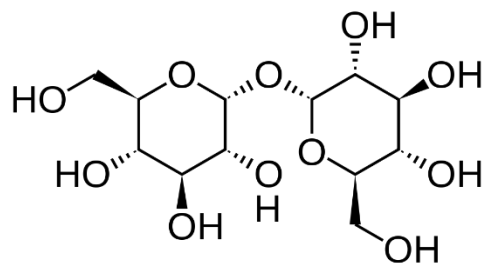
9. ábra: A sejthártya felépítésének sematikus ábrázolása: a foszfolipidek és a fehérjék elhelyezkedése a sejthártyában (A), valamint a hőmérséklet csökkenés hatására kialakuló változások a sejthártyában: a foszfolipidek kristályos (a) és hexagonális-II (b) elrendeződése, összecsapódott fehérjék (c) (B) (Forrás: Horváth et al, 2006b)

A vitrifikáció hatékonysága fokozható az oldat viszkozitásának növelésével. Erre a célra különböző fehérjék használhatóak, többek között a BSA, FBS (magzati borjú szérum), valamint a szeminális plazma. A szeminális plazma összetétele révén képes csökkenteni a halsperma mélyhűtés során fellépő káros hatásokat (Lahnsteiner et al., 1998). Ezt a megfigyelést leírták már többek között ló (Moore et al., 2005), vadkan (Okazaki & Shimada, 2012), valamint kos és bika (Graham, 1994) sperma mélyhűtés esetében is. A szeminális plazma felhasználásakor figyelembe kell venni az állategészségügyi kockázatokat: halak esetében ez a kockázat jelentősen alacsonyabb, mint az emlősöknél, mivel a számos halfajra jellemző külső termékenyítési módnak köszönhetően a fertőzések esélye alacsony. Emellett az egyedi tenyészték halak esetében szintén alacsony emlős fajokhoz viszonyítva, így a belső termékenyítésű fajoknál sincs olyan kockázat, mint egy kiemelt tenyésztékű szarvasmarha vagy ló esetében. Fontos, hogy a szeminális plazma későbbi eredményes felhasználásához a sperma fejésénél el kell kerülni a vérrel vagy ürülékkel való szennyeződést, mivel ezek rontják a sperma minőségét, valamint táptalajul szolgálnak a baktériumoknak (Alavi, et al., 2008), emellett a szennyezett sperma szeminális plazmájának összetétele szignifikánsan megváltozik (Ciereszko & Dabrowski, 1994). A hűtőmédiüm

szeminális plazmával történő kiegészítésének kedvező hatását leírták a halsperma vitrifikáció során (Merino et al., 2011), azonban a szerző szintén szintetikus analóg használatát javasolja a mikrobioális fertőzések elkerülése érdekében.

2.5.2. Szénhidrát kiegészítés

A különböző ozmoprotektáns szénhidrátok közül a mélyhűtési vizsgálatokban kiemelt szerepe van a trehalóznak. A trehalóz egy természetes alfa kötésű diszacharid (10. ábra), bioszintézise egyes gombákban, növényekben és néhány gerinctelen állatban történik. Membránstabilizáló hatása révén (Fuller, 2004) trehalóz kiegészítéssel eredményesebben őrizhetők meg biológiai minták, mint más cukrok használatával (Crowe et al., 1996). Számos publikáció számol be a trehalóz vitrifikációs hatékonyságot növelő hatásáról (Aksan & Toner, 2004; Berlinguer et al., 2007; Green & Angell, 1989; Wusteman et al., 2008).



10. ábra: A trehalóz szerkezete. Forrás: Internet5

Halsperma mélyhűtés és vitrifikáció témakörében kevés irodalmi adat elérhető a trehalóz kiegészítés hatásáról. Egy 2015-ben megjelent cikkben 100 mM trehalóz és 50 mM taurin együttes használatával sikeresen növelték a halsperma mélyhűtés utáni felolvasztást követően mért motilitás értékeit (Liu et al., 2015). Egy másik cikk eredményei szerint a halsperma felolvasztás utáni mozgásának sebessége csak abban az esetben nem csökkent szignifikánsan, ha trehalózt is tartalmazott a hűtőmedium (Koh et al., 2010). A trehalóz védőanyagként történő felhasználásának előnye, hogy kevésbé toxikus, mint más krioprotektív anyagok (Vuthiphandchai et al., 2009). Egy lazacféle esetében spermagónium mélyhűtése során a trehalóz ozmoprotektáns hatékonyságát három más szénhidráttal (glükóz, raffinóz, galaktóz) hasonlították össze, és a trehalóz

szignifikánsan hatékonyabbnak bizonyult a másik három vizsgált cukornál (Yoshizaki & Lee, 2016).

2.5.3 Koleszterol kiegészítés

A koleszterol fontos szerepet játszik a spermiumok élettani funkcióinak fenntartásában, többek között stabilizálja a membránokat alacsony hőmérsékleteken. Ebből adódóan a magas koleszterol/foszfolipid aránnyal rendelkező fajok spermiumai jobban tolerálják a hidegsokkot, mint azon fajok spermiumai, ahol ez az arány alacsony. A spermium membrán koleszterol tartalmának növelésével (koleszterollal telített ciklodextrinekkal kezelve) növelhető a mélyhűtött-felolvasztott sperma minősége (Mocé et al., 2010). A mélyhűtött sperma felolvasztását követően fontos a koleszterol kivonása, mivel a koleszterol a membránstabilizáló hatása mellett részlegesen gátolja az akroszóma-reakciót, ezáltal csökkenti a termékenyülési arányt. A koleszterol felolvasztást követő kivonásával azonban ez a negatív hatás nem megfigyelhető (Oliveira et al., 2010). A koleszterol pozitív hatását leírták mén, (Moore et al., 2005; Oliveira et al., 2010), bika (Mocé & Graham, 2006), vadkan (Lee et al., 2015), kecske (Mocé et al., 2014) és kos (Mocé et al., 2010) sperma esetében.

Emlősökkel szemben a legtöbb halfaj spermiumának nincs akroszómája, ezért a koleszterol akroszóma reakciót gátló negatív hatása ezekben az esetekben nem fejeződik ki. Szivárványos pisztráng fajon vizsgálták a membrán koleszterol tartalmának növelését: a felolvasztás utáni membránintegritást sikeresen növelték, azonban a felolvasztott sperma termékenyítő képességét nem növelte az eljárás (Müller et al., 2008).

2.6. A kísérleti halfajok jelentősége

2.6.1. Laboratóriumi modell halfaj

A zebradánió széleskörűen alkalmazott modell faj, melyet humán betegségek tanulmányozására (Bakkers, 2011; Lieschke & Currie, 2007; Malhotra & Sebat, 2012; Seth et al., 2013; Sullivan & Kim, 2008), fejlődésbiológiai és transzgenikus modellként (Ellett & Lieschke, 2010; Lele & Krone, 1996), valamint toxikológiai tesztrendszerben (Dai et al., 2014; Hill et al., 2005; MacRae & Peterson, 2015; Spitsbergen & Kent, 2003, 2007) egyaránt alkalmaznak. A faj kis testméretéből adódóan az egy egyedhez tartozó sperma hagyományos módszerekkel történő mélyhűtése nem kivitelezhető (Tiersch et al., 2012; Yang & Tiersch, 2009). A modellként alkalmazott fajok genetikai állományának megőrzése kiemelt fontosságú kutatási terület (Mazur et al., 2008).

2.6.2. Természetvédelmi szempontból jelentős halfajok

Az európai angolna mesterséges szaporítása napjainkban jelentősen kutatott terület (Peñaranda et al., 2008), ám a tudomány jelenlegi állása szerint nem kivitelezhető a sikeres szaporítást követő lárwanevelés (Müller et al., 2012). A sikeres lárwanevelés jelenlegi korlátai miatt is kiemelt szerepe van a faj genetikai tartalékai *in vitro* megőrzésének. Az angolna a veszélyeztetett státusza mellett nagy gazdasági jelentőséggel bír a tengeri és édesvízi halászatban, valamint az intenzív haltermelésben (Pintér, 2015).

A márványpisztráng állománya folyamatosan csökken, élőhelyéről fokozatosan kiszorítják más fajok kompetíció, illetve hibridizáció révén (Berrebi et al., 2000; Crivelli et al., 2000). A faj a többi pisztrángféléttől különleges, márványszerű színezete, és kiemelten magas növekedés rátája révén különül el, ezen tulajdonságai miatt a gazdasági jelentősége (horgászati hasznosítás) kiemelt. Napjainkban csupán nyolc genetikailag tiszta márványpisztráng populáció található a szlovéniai Soča folyó vízgyűjtőjében.

Az adriai pér a pénzes pér faj egy genetikailag különálló populációja, Szlovéniában egyetlen folyó vízrendszerében él (Horváth et al., 2015; Horváth et al., 2012; Sušnik et al., 2004). A populációt veszélybe sodorta a más vízgyűjtőkből származó pérállományok betelepítése, ami nem kívánt hibridizációhoz és introgresszióhoz vezetett. A helyzet javítására a Tolmini Horgászegyesület munkatársai minden évben mélyhűtik a vad populációk spermáját, és az azzal történő termékenyítéseket követően kitelepítéseket végeznek, ezzel növelve az egyedszámot.

2.6.3. Gazdasági jelentőségű halfajok

A sebes pisztráng, ponty, compó és sügér (más néven csapósügér) halfajok a halgazdasági termelésben foglalnak el fontos helyet (De Groot, 1987; Purdom, 1993; Woynarovich et al., 2011). Hazánkban a haltermelés mellett horgászati hasznosításban fontos szerepe van a pontynak és a pisztrángfajoknak. A compó és a sügér szintén jelen van a horgászvizekben, azonban jelentőségük csekélyebb (Pintér, 2015).

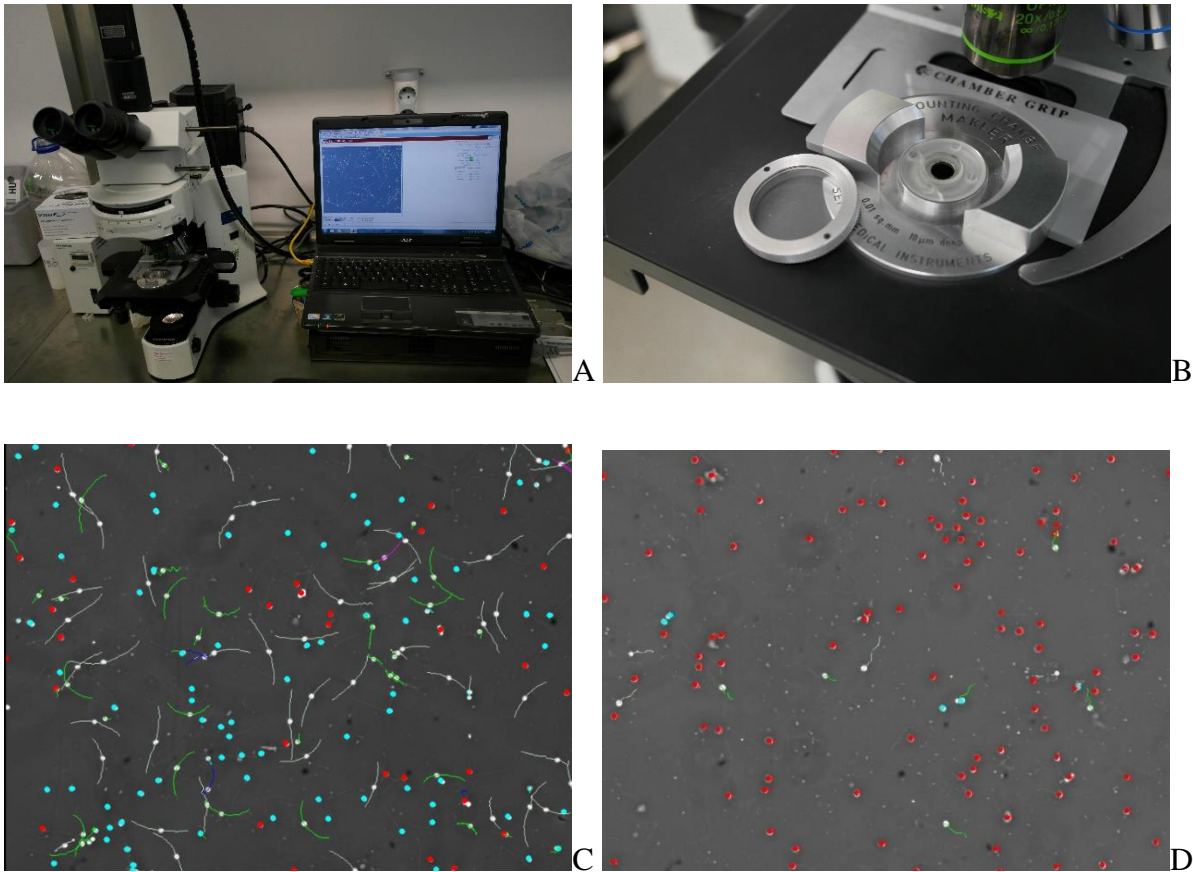
3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1. Kísérleti állomány és sperma minősítés

A kísérletek során az állatokat érő stressz minimalizálására törekedtünk, a vizsgálatokat az Élelmiszerbiztonsági Kormányhivatal és az Állategészségügyi Kormányhivatal engedélyezte (engedély szám: XIV-I-001/2299-4/2012, Pest megye, Budapest, Magyarország). A vizsgálatok során felhasznált vegyszereket a Sigma-Aldrich (Budapest, Magyarország) és Reanal (Budapest, Magyarország) cégektől szereztük be. A sperma-vitrifikációs kísérletek során a halak különböző intézményekben voltak elhelyezve (3. táblázat). A halaktól a spermát fejéssel nyertem ki. A halakat altatásban fejtem a gyakorlatban alkalmazott altatási módszertan (angolna: 60 mg/l benzokain, sügér és zebradánió: 150 mg L⁻¹ MS-222, többi halfaj: 0,4 ml/l 2-fenoxietanol) szerint. Ponty, compó, sügér és angolna fajok esetében a fejést hormonális indukció előzte meg. A spermavételt követően a halakat altatóoldattól mentes, oxigénben dús vízbe helyeztük. A kísérletek megkezdéséig a spermát olvadó jégen tároltuk (maximum 30 percig). Az ősvarsejt-vitrifikációs vizsgálatok esetében a halak (ponty és zebradánió) túlaltatását követően az ivarszerveket kimetszettük. Az egyes fajokra jellemző egyedi kezeléseket az alábbiakban csoportosítva fejtem ki (3.1.1. fejezettől kezdődően).

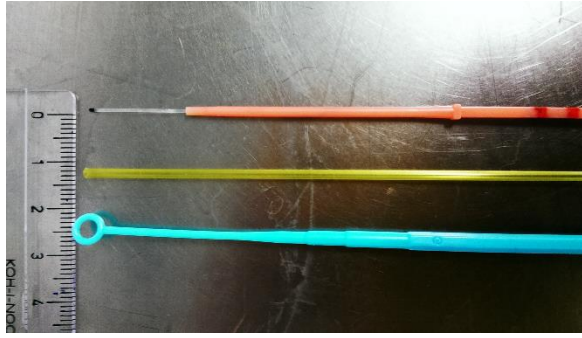
Az összegyűjtött sperma minőségét az aktivációt követő motilitás mérésével határoztam meg számítógépes spermavizsgálati rendszer (CASA) használatával (11. ábra). A sperma aktivációját fajspecifikus oldatokkal végeztem, melyekhez minden esetben BSA-t (0,01 g/ml) kevertem a sejtek üvegre tapadásának gátlásához. A CASA rendszer a Sperm Vision® nevű szoftvert használja, amely felismeri a mozgó és statikus sejteket. A rendszer által mért számos paraméter közül a progresszív motilitást választottam a vitrifikációs protokollok értékeléséhez (Rurangwa et al., 2004; WHO, 2010; Wilson-Leedy & Ingermann, 2007). A CASA-t az alábbi beállításokkal használtam:

- progresszív motilitás küszöbértéke (minden halfaj esetében): DSL (megtett egyenes útvonal a mozgás kiindulási- és végpontja között) >5 μm ,
- pixel/ μm arány: 151/100,
- fej terület méret: zebradánió 1-50 μm^2 , angolna 5-80 μm^2 , sügér 1-80 μm^2 , a többi halfajnál általánosan használt 1-100 μm^2 .



11. ábra: A Halgazdálkodási Tanszék laboratóriumában található CASA berendezés: számítógépes rendszerrel összekötött mikroszkóp használat közben (A) és a mikroszkóp objektívje alá helyezett Makler kamra (B), CASA felvétel friss (C), valamint vitrifikáció után felolvasztott zebradánió sperma vizsgálatakor (D). A piros színnel jelölt sejtek immotilisak (nem mozognak), a zöld sejtek progresszíven mozognak (a jelölt vonal mentén), a sötétkék sejtek körkörösén mozognak, a fehérek lineáris, a lilák nem-lineáris, a világoskékék lokális mozgást végeznek.

A spermát fajonként optimalizált izotóniás hűtőmediummal hígítottam, majd hozzáadtam a védőanyagokat különböző koncentrációban. A vitrifikációs technikák hatékonyságát műszalmás, oltókacsos és Cryotop-os (Kuwayama, 2007) módszerrel is teszteltem (12. ábra). Minden esetben közvetlenül folyékony nitrogénbe helyeztem az oldatot tartalmazó eszközt, előzetes nitrogéngőzben végzett hűtés nélkül. A vitrifikáció eredményességét vizuális megfigyeléssel is vizsgáltam: a jégkristályok képződésével járó fagyott anyag tejszerű, míg a vitrifikált oldat üvegszerűen áttetsző.

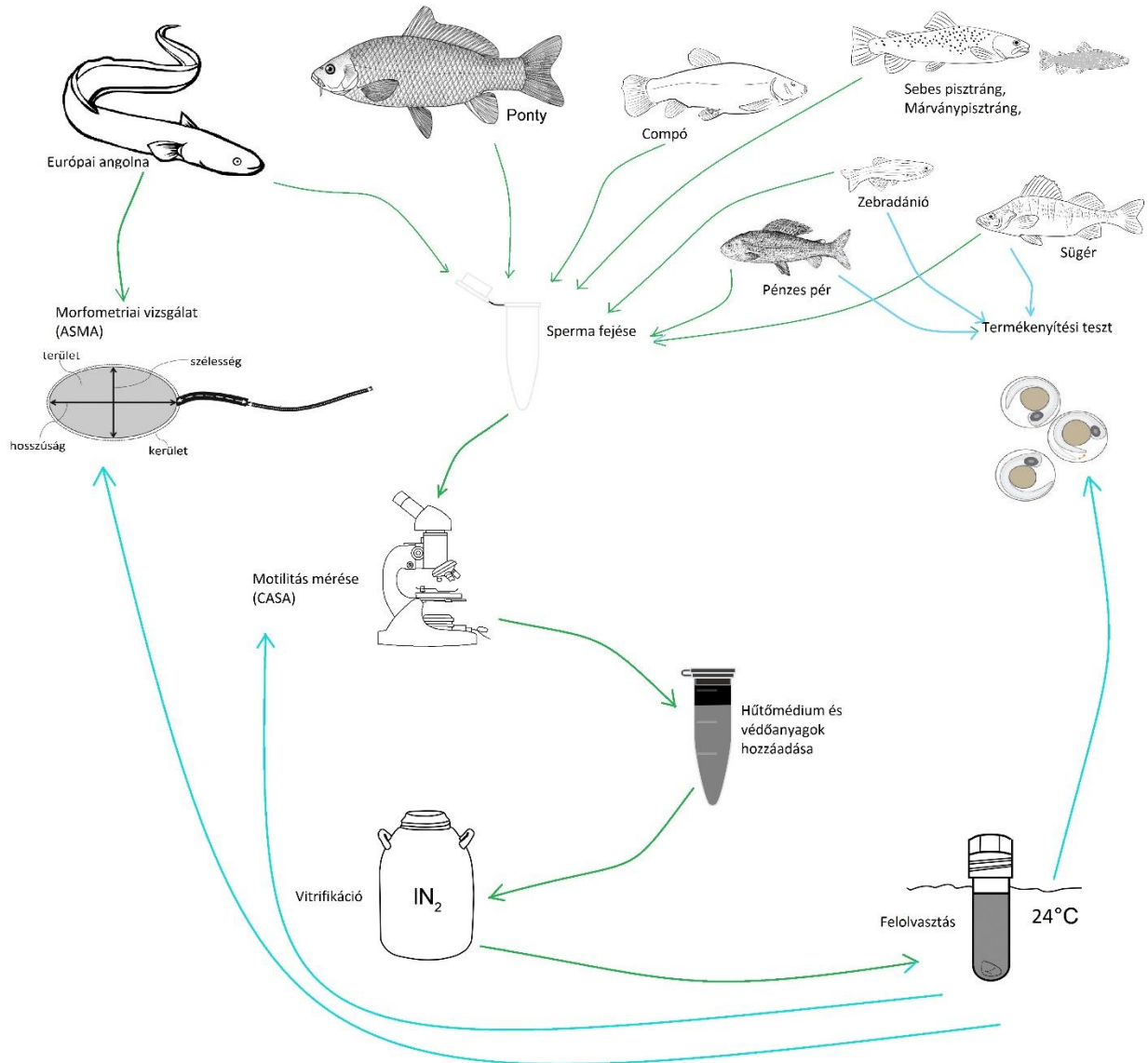


12. ábra: Vitrifikációs eljárások során használt eszközök: Cryotop, műszalma, oltókacs

A Cryotopon és oltókacson vitrifikált szuszpenziókat közvetlenül az aktiváló oldatba helyezve olvasztottam fel, a folyékony nitrogénből történő kivétel és az aktiváló oldatban történő felolvasztás között eltelt idő minden esetben 1 másodperc volt (stopperrel mérve, N=50). A műszalmákat vízfürdőben olvasztottam 40°C-on, 11 másodperc alatt.

A felolvasztás utáni motilitás értékek mellett zebradánió- és angolnasperma esetében a membránintegritást is vizsgáltam (13. ábra). A Valenciái Műszaki Egyetemen végzett vizsgálatok során angolna spermiumok membránintegritás vizsgálatánál a PI/SYBR 14 festést használtam, azonban a Szent István Egyetemen végzett zebradánió sperma festésekor PI/SYBR Green festést használtam (Horváth et al, 2012). A mintákat fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltam: az élő sejtek zöld színűek, az elpusztult sejtek pirosak. Az életképesség vizsgálata során a QCapture Pro (QImaging, Canada) szoftver segítségével a megfestett mintákról digitális felvételeket készítettem, majd a fényképeken számoltam a membrán-intakt (zöld) sejtek arányát az ImageJ 1.50i (National Institutes of Health, USA) szoftverrel. Azon fajok esetében, ahol rendelkezésünkre állt megfelelő minőségű nőivarú állomány, termékenyítési tesztet végeztem. Angolna faj esetében morfológiai vizsgálatokat végeztem a vitrifikált spermiumokon.

13. ábra. Különböző halfajokon elvégzett kísérleti elemek összegzése (zöld nyilak: friss spermával végzett vizsgálatok, kék nyilak: vitrifikált-felolvasztott spermával végzett vizsgálatok).

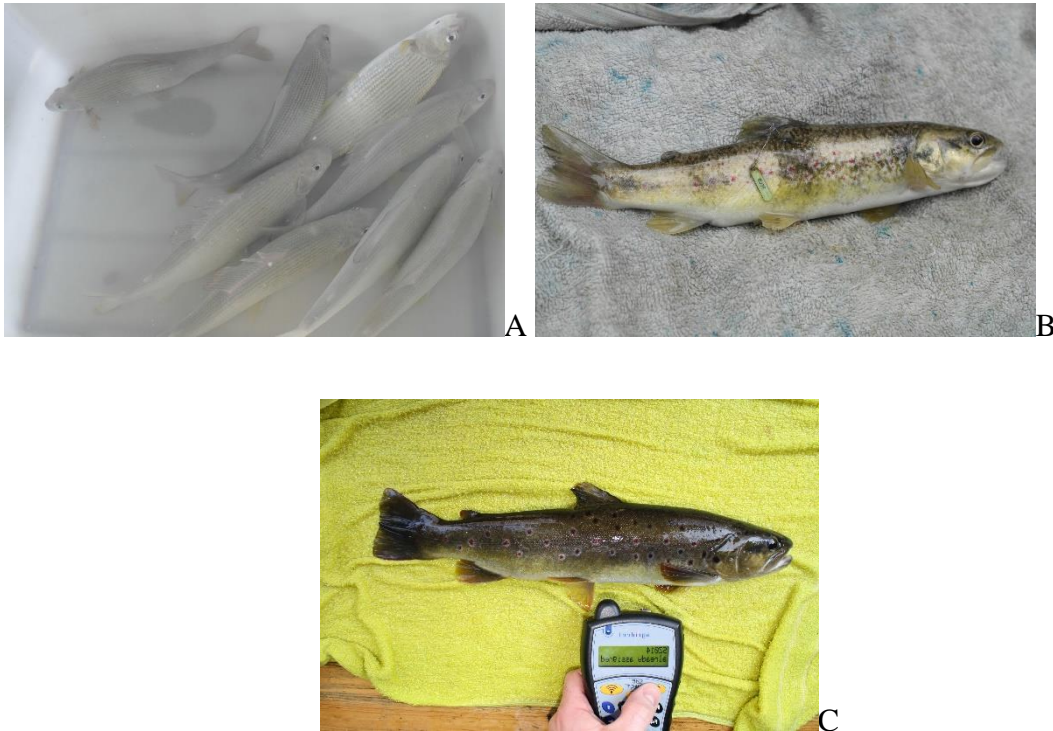


3. Táblázat. A különböző fajok spermáján végzett vitrifikációs vizsgálatok időpontjai és helyszínei.

Faj	Vizsgálatok időpontjai	Helyszín
Európai angolna, magyar állomány	2014 április, október, 2015 június, július	SZIE AKI Halgazdálkodási Tanszék
Európai angolna, spanyol állomány	2014 március, április, november, december	Valenciai Műszaki Egyetem, Spanyolország
Compó	2014 június, július, 2015 július	SZIE AKI Halgazdálkodási Tanszék
Márványpisztráng	2015 november	Tolmini Horgász Egyesület, Szlovénia
Pénzes pér	2015 április, 2016 április	Tolmini Horgász Egyesület, Szlovénia
Sebes pisztráng	2016 január	Lillafüredi Pisztrángtelep
Ponty	2014 május, 2015 május, június	SZIE AKI Halgazdálkodási Tanszék
Sügér	2013 december, 2014 január, február, március, november, december, 2015 január, február, március, április	SZIE AKI Halgazdálkodási Tanszék
Zebradánio	2013 szeptembertől folyamatosan (2016 decemberig)	SZIE AKI Halgazdálkodási Tanszék

3.1.1. Lazacfélék

Lazacféléktől mind a három vizsgált faj (14. ábra) esetében ívási időszakban végeztem a spermagyűjtést.



14. ábra: A vizsgált lazacfélék: pénzes pér (A), márványpisztráng (B), sebes pisztráng (C)

3.1.1.1. Pénzes pér

2015 és 2016 áprilisában végeztem a vizsgálatokat a Tolmini Horgász Egyesület (Ribiška Družina, Tolmin, Szlovénia) telepén található egyedek (n=20) spermájának felhasználásával. A 2016-os vizsgálatok során termékenyítési tesztet is végeztem (15. ábra), az ikrás egyedek szintén az egyesület tenyészállományából származtak.

Az optimális sperma vitrifikációs módszer kidolgozása után az alábbiakat vizsgáltam pér fajban:

- hígítóoldatok összehasonlítása: pér szemínális plazma és pér hígító,
- a vitrifikációs oldat trehalóz kiegészítésének vizsgálata (0/0,2/0,4 M trehalóz).



15. ábra: Vitrifikált spermával termékenyített pénzes pér ikra a Tolmini Horgász Egyesület keltetőházában.

3.1.1.2.Márványpisztráng

2015 novemberében végeztem a vizsgálatokat a Tolmini Horgász Egyesület telepén található egyedek (n=10) spermájának felhasználásával.

A vizsgálatok során az alábbi módszereket hasonlítottam össze, minden védőanyag-kombinációt Cryotopon és oltókcson egyaránt vizsgálva:

- 1. védőanyag kombináció (CP1): 20% MeOH + 20% PG (Kása et al., 2016)
- 2. védőanyag kombináció (CP2): 10% DMSO + 30% EG (Cuevas-Uribe et al., 2013)
- 3. védőanyag kombináció (CP3): 20% glicerin + 20% EG (Cuevas Uribe, 2011a)
- 4. védőanyag kombináció (CP4): 20% MeOH + 10% MG + 10% PG (Cuevas-Uribe et al., 2011b)

3.1.1.3.Sebes pisztráng

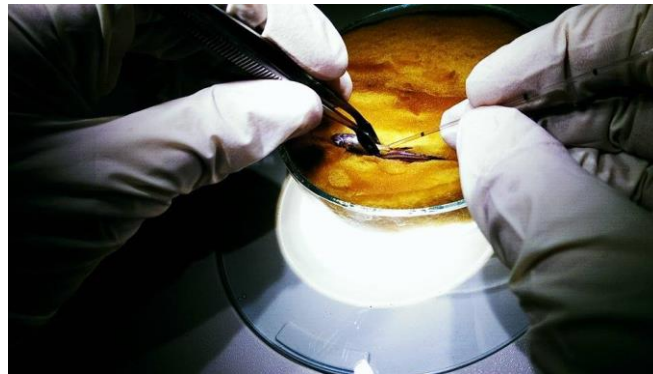
2013 és 2016 között a természetes szaporodási szezonban (novembertől januárig) végeztem a vizsgálatokat a Lillafüredi Pisztrángtelep állományán (n=10). Sebes pisztráng fajban a lazacfélésre kidolgozott vitrifikációs módszert teszteltem motilitás és termékenyülés értékeket mérve.

3.1.2. Pontyfélék

3.1.2.1. Zebradánió

A vizsgált zebradánió egyedek (n=30) a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén tartott AB vonalból kerültek ki. Ezt az állományt 2013 őszétől 2016 tavaszáig használtam kísérleteim során. Egy csoportba tartozó tejeseket (15 egyed) hetente egy alkalommal fejtem, mivel 7 nap elegendő a halaknak a sperma újratermelésére.

A zebradánió hímek fejését üvegapillárisal, mikroszkóp alatt végeztem (16. ábra). A fajtól gyűjthető sperma mennyisége általában nem éri el az 1 μ l-t, így ez az egyedüli módszer, amivel boncolás nélkül kinyerhető a hal ivarterméke. A halakat vizsgálat előtt MS-222 oldatban altattam, a lefejt spermát HBSS oldatba helyeztem a vizelettel való szennyeződés által okozott aktiváció gátlására (Jing et al., 2009).



16. ábra: Szivacson rögzített zebradánió sperma fejése mikroszkóp alatt, a has csipesszel történő kétoldali nyomásával, üveg kapillárisal.

A termékenyítési teszt elvégzéséhez a nőivarú egyedek ikráját altatást követően száraz Petri csészébe fejtem (hasfal nyomásával), majd 10 egyedtől származó ivarterméket műanyag spatulával összekevertem az ikra-minőség egységessé tételére. Kontroll termékenyítést frissen fejt spermával végeztem, a vitrifikált mintával azonos sperma:ikra arányt alkalmazva a termékenyítéskor.

A vizsgálatok során először az alábbi két, előkísérleteim alapján zebradánió sperma vitrifikációra hatékonynak talált védőanyag-kombinációt hasonlítottam össze:

- 10% MeOH + 10% PG + 10% MG,
- 15% MeOH + 15% PG.

Ezt követően az optimális védőanyag-kombinációt különböző trehalóz kiegészítésekkel (0/0,2/0,4M) hasonlítottam össze, majd a leghatékonyabb módszer eredményességét termékenyítési próbával is teszteltem.

3.1.2.2. *Ponty*

A 16 hímivarú ponty (testtömeg: 1582 ± 221 g, teljes testhossz: $46,5 \pm 2$ cm) a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszék haltartó épületében került elhelyezésre, az állomány az Aranyponty Zrt.-től származott. A halak spermiációját 24 órával a tervezett fejés előtt 2,5 mg/ttkg hasüregbe oltott hipofízis injekcióval indukáltam.

Az optimális sperma vitrifikációs módszer kidolgozása után az alábbiakat vizsgáltam ponty fajban:

- hígítóoldatok összehasonlítása: ponty szemínális plazma és pér hígító,
- a vitrifikációs oldat trehalóz kiegészítésének vizsgálata (0/0,2/0,4 M trehalóz).

3.1.2.3. *Compó*

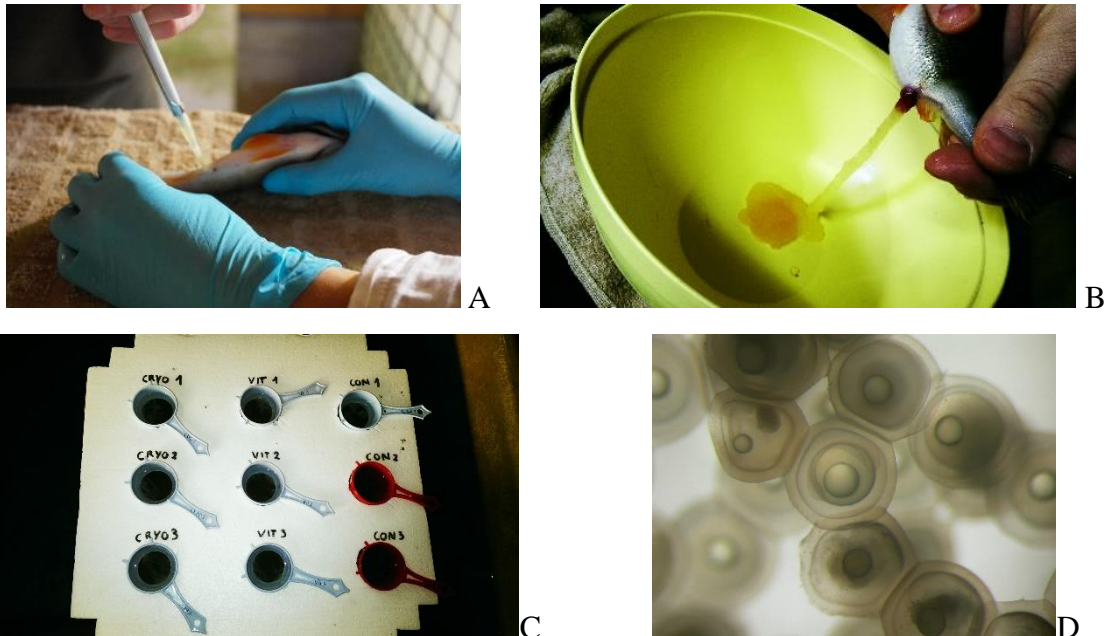
A 17 hímivarú compó (testtömeg: 500 ± 48 g) a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszék haltartó épületében került elhelyezésre. A halak spermiációját 24 órával a tervezett fejés előtt 10 mg/ttkg hasüregbe oltott hipofízis injekcióval indukáltam.

Compó fajban az optimális hígítási arány meghatározása volt az elsődleges cél, ezt követően a trehalóz kiegészítés (0/0,2/0,4 M trehalóz) hatását vizsgáltam.

3.1.3. *Sügerfélék*

A 27 tejes (teljes testhossz: $19,5 \pm 4$ cm; testtömeg: 101 ± 67 g) és 14 ikrás (testtömeg: 106 ± 57 g) egyedből álló csapósüger állomány tavakból történő lehalászás után a Halgazdálkodási Tanszék haltartó épületében került elhelyezésre. A sperma fejését a hormonális indukciót (250 IU kg^{-1} hCG) követő hatodik napon végeztük, mivel korábbi vizsgálataink eredményei alapján ebben az időintervallumban a legnagyobb a sperma mennyisége és legjobb a minősége. Altatást követően (MS-222 , 150 mg L^{-1}) az ivarnyílás környékét papírtörülővel szárazra töröltem, majd ezt követően 1,5 ml-es Eppendorf csövekbe fejtem a spermát a has oldalsó részére kifejtett nyomással. A friss spermaminták (17/A ábra) vizsgálatát követően a 80% progresszív motilitásnál magasabb értéket mutató mintákkal dolgoztam tovább.

A termékenyítési tesztekhez a sügér ikrásokat egyszeri hormon injekcióval kezeltem (hCG, 500 NE/testtömeg kg, Ferring, Saint Prex, Svájc), ezt követően petefészek biopsziával minden nap megvizsgáltam az érő oocytákat az ovuláció várható időpontjának becsléséhez. A vizsgálatokhoz az ikrát Serra-féle felvilágosító oldatba helyeztem (70%-os etanol, 40%-os formaldehid és 99,5%-os ecetsav 6:3:1 arányú keveréke). Az olajcsepp mérete és elhelyezkedése alapján határoztam meg az ikrá érettségét és az ovuláció bekövetkezésének feltételezett időpontját: az ovulációhoz közeli állapotban lévő ikraszemekben egyetlen nagy méretű olajcsepp látható (Zarski et al., 2012). A várható ovuláció előtti napon az ivarnyílást bevarrtam a spontán ikraleadás elkerülésére, majd az ikrá fejése előtt a varrást eltávolítottam és az ivarnyílás környékét szárazra töröltem. Az ikrát száraz edénybe fejttem (17/B ábra), felhasználásig hűtve tároltam (4° C-on). A termékenyítési százalékot inkubációt (17/C ábra) követően számoltam fénymikroszkóp alatt (17/D).



17. ábra: Sügér sperma (A) és ikrá (B) fejése, a termékenyített ikrák inkubálása (C), fejlődő embriók fénymikroszkóppal fotózva (D).

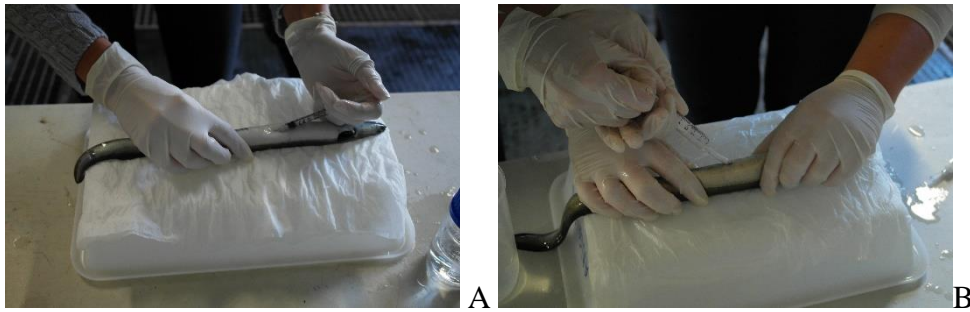
A vizsgálatok során az alábbi védőanyag-kombinációkat hasonlítottam össze:

- 10% MeOH + 10% PG + 10% MG
- 10% MG + 10% PG
- 15% MG + 15% PG
- 20% MG + 20% PG.

Ezt követően a legmagasabb motilitást eredményező módszerrel vitrifikált spermával végeztem termékenyítési próbát.

3.1.4. Angolnafélék

Az európai angolna esetében vizsgáltam egy magyar és egy spanyol állomány spermájának vitrifikációját. A spanyol egyedek (n=30) a Valenciái Műszaki Egyetem haltartó épületében kerültek elhelyezésre 96 literes akváriumokban. A halak átlagos testtömege 115 ± 8 g volt. A magyar angolna állomány (n=10) a Balatonból származott, és a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének haltartó épületében volt elhelyezve.

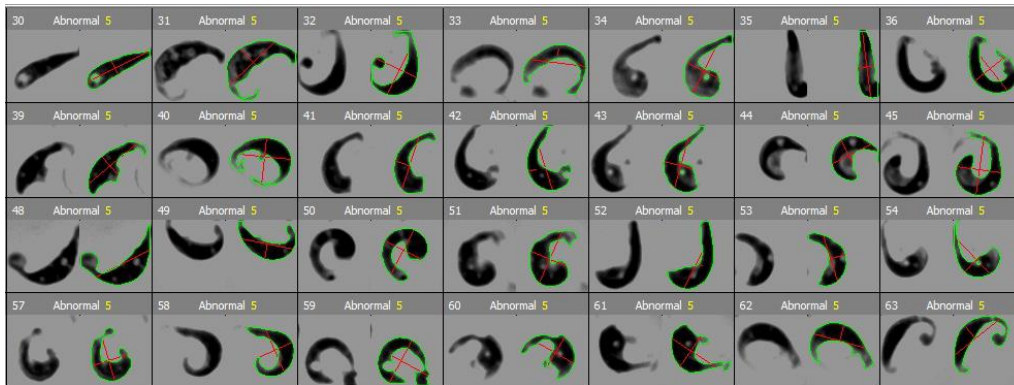


18. ábra: Európai angolna hormonális kezelése (A) és hasi nyomással, fecskendővel történő spermagyűjtés (B)

A halakat minden esetben hormonális injekcióval kezeltük a spermiáció indukálására (hCG, 1,5 IU/g testtömeg, 18/A ábra). A mintavételekre (18/B ábra) a rendszeres hetenkénti hormonális kezeléssorozat 8. és 10. hete között került sor, mivel a sperma minősége ebben az időszakban a legjobb (Perez & Asturiano, 2000). A mintavételekre az aktuális heti hormonkezelés után 24 órával került sor.

A spermagyűjtés mindkét állomány esetében azonos módon történt: altatást követően (60 mg/l benzokain) a szárazra törölt ivarnyílású angolnák spermáját hasi nyomással nyertem ki, majd pipettával gyűjtöttem össze. A spermát 15 ml-es centrifugacsövekben olvadó jégen tároltam további felhasználásig.

A spanyol angolnaállomány esetében a motilitás értékek vizsgálata mellett a spermiumok fejének morfometriai elemzését is elvégeztem az ASMA szoftverrel (Computer Automated Sperm Head Morphometry Analysis, Sperm Class Analyser, Morfo Version 1.1, Imagesp, Barcelona, Spain). Glutáraldehydes fixálást (1:20 v/v, 5%-os glutáraldehyd sóoldatban) követően minden mintában 100 spermium fejről készítettem felvételt, melyekből a program kerület- és terület adatokat számolt, ezek átlagértékeit hasonlítottam össze a különböző kezelési csoportok között (19. ábra).



19. ábra: Morfometriai elemzéshez rögzített angolna spermium-fejek képei 100x nagyításban, glutáraldehides fixálást követően.

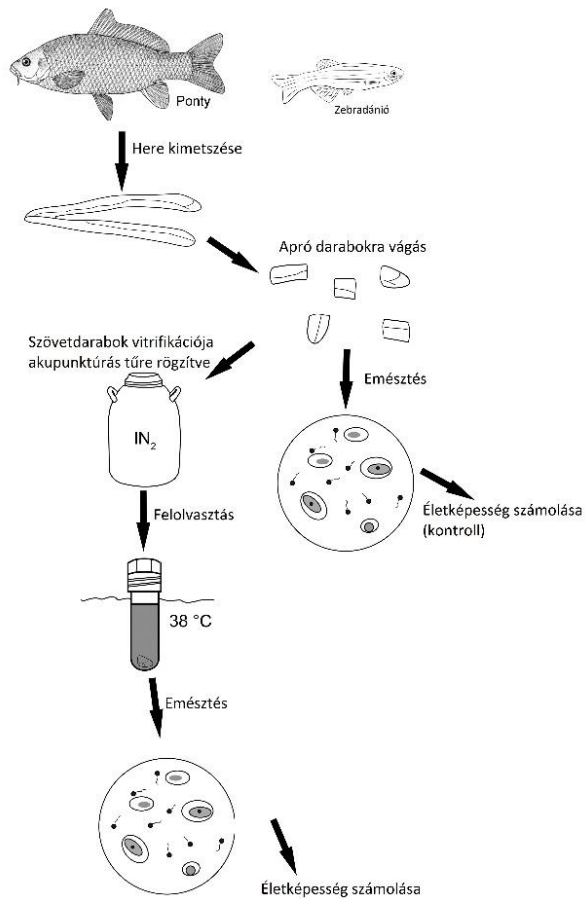
A vizsgálatok során elsőként az alábbi védőanyag-kombinációkat hasonlítottam össze:

- 10% MeOH + 10% PG + 10% MG
- 20% MeOH + 20% PG.

Ezt követően a hígító trehalóz kiegészítésének hatását vizsgáltam különböző koncentrációkkal (0/0,2/0,4/0,8M trehalóz).

3.2. Spermogóniumok vitrifikációja

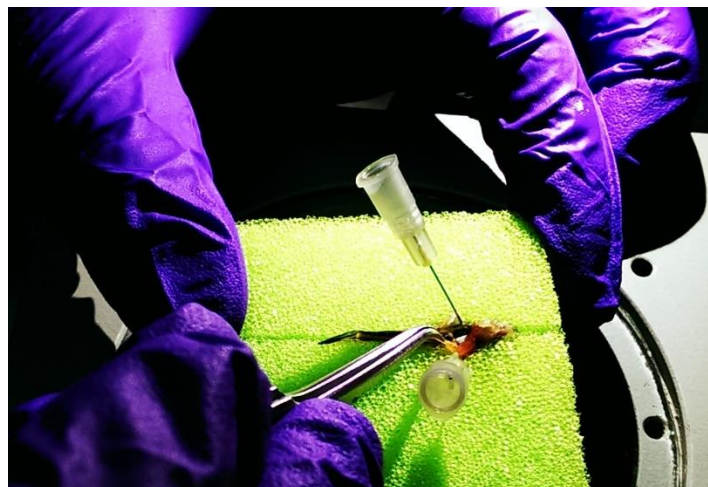
A hal ivari őssejtek vitrifikációs protokolljainak kidolgozásához a zebraadániót és a pontyot választottam modellnek (20. ábra). Ezen vizsgálatok esetében az ivarszervet műtéti úton eltávolítottam a halak túlaltatását (MS-222 oldat) követően. A zebraadánió esetében az ivarszervek kivételét mikroszkóp alatt végeztem. A kioperált szerveket L-15 izotóniás oldatba helyeztem (Leibovitz, 1963).



20. ábra. A ponty és zebradánió fajokon végzett spermogónium vitrifikációs vizsgálatok sematikus ábrája. (Marinović, 2017 alapján)

3.2.1. Zebradánió spermogóniumok vitrifikációja

A vizsgálatokhoz 10 zebradániót túllattam, a heréket mikroszkóp alatt kimetszettem (21. ábra), majd L-15 médiumba helyeztem.



21. ábra. Zebradánió hereszövet eltávolítása mikroszkóp alatt.

A szövetdarabokat akupunktúrás tűkre rögzítettem (22/A ábra), majd a tűkre helyezett szöveteket kétlépéses protokoll során helyeztem a hűtőmediumokba (22/B ábra). Számos védőanyagot teszteltünk különböző koncentrációkban és kombinációkban, kétlépéses hozzáadással:

-első lépés: ekvilibrációs oldatba (E) helyezés (5 perc),

-második lépés: vitrifikációs oldatba (V) helyezés (30 másodperc).

Minden ekvilibrációs médiumot minden vitrifikációs médiummal kombinálva teszteltünk. Az alkoholok (lásd: 3. táblázat) mellett minden hűtőmediumban ozmoprotektánsként trehalóz kiegészítést (0,5 M), a viszkozitás növelésére pedig fehérje kiegészítést (10% FBS), valamint 25mM Hepes kiegészítést alkalmaztunk.

3. táblázat: Az egyes ekvilibrációs (E1-E3) és vitrifikációs (V1-V3) oldatok összetétele.

Védőanyag	Összetétel
E1	1,5 M MeOH + 1,5 M PG
E2	1,5 M MeOH + 1,5 M DMSO
E3	1,5 M PG + 1,5 M DMSO
V1	1,5 M MeOH + 4,5 M PG
V2	1,5 M MeOH + 5,5 M DMSO
V3	3 M PG + 3 M DMSO

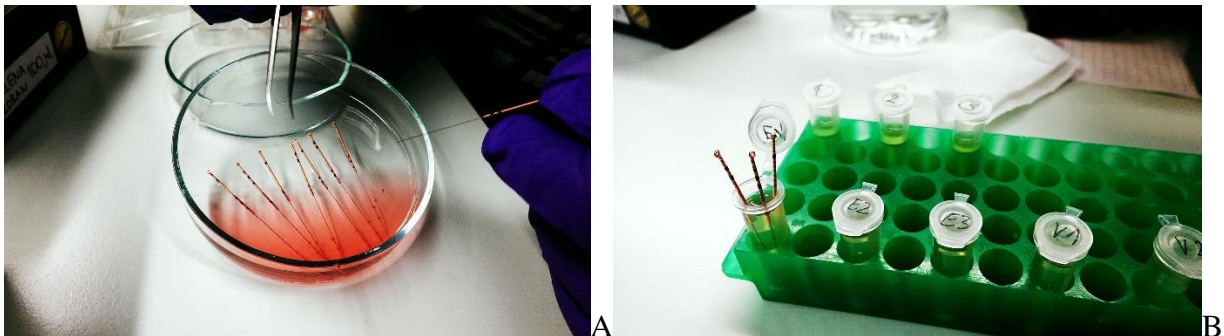
Az olvasztás az ozmotikus sokk minimalizálása érdekében 3 lépcsős protokoll alapján történt:

1. 10% FBS + 0,3 M trehalóz (1 perc)
2. 10% FBS + 0,1 M trehalóz (3 perc)
3. 10% FBS (5 perc)

A friss szövetet, majd felolvasztást követően a vitrifikált szövetet emésztettem és festettem az alábbi multi-enzimatikus emésztési módszertan szerint:

1. 370 µl L-15 oldat kimérése
2. Szövetdarab hűtőmediumba helyezése és aprítása
3. 50 µl kollagenáz oldat (20 mg/ml) hozzáadása
4. 75 µl tripszin oldat (10 mg/ml) hozzáadása
5. 5 µl DNáz-I oldat (1 mg/ml) hozzáadása

6. Összekeverés
7. 24°C-on 90 perces inkubáció rázóasztalon
8. Emésztési folyamat leállítása: 400 µl L-15 médium és 100 µl FBS hozzáadása
9. Szűrés (50 µm-es szűrőn át)
10. Centrifugálás (50×g, szobahőmérsékleten, 10 perc)
11. A felülúszó eltávolítása
12. A képződött pellet reszuszpendálása 20 µl L-15 oldatban
11. Életképesség vizsgálata tripán-kék festéssel (1:1 hígításban), sejtszámlálás Makler-kamrával



22. ábra. Zebradánio hereszövet darabok rögzítése akupunktúrás tűkre (A) és a tűk vitrifikációs médiumba helyezése.

3.2.2. Ponty spermatogóniumok vitrifikációja

Ponty faj esetében a módszertan és a vizsgált ekvilibrációs és vitrifikáló oldatok összetétele megegyezett a 3.2.1. fejezetben leírtakkal, azzal az eltéréssel, hogy amíg a zebradánio kis testméretéből adódóan teljes heréket rögzítettem az akupunktúrás tűre, ponty esetében a herét 40 mg-os darabokra vágtam (a szövetdarabok egyedi tömegét mérlegem ellenőriztem), és ezeket vitrifikáltam a tűkre rögzítve.

3.3. Statisztikai analízis

A vitrifikációs vizsgálatok adatainak statisztikai elemzéséhez a GraphPad Prism (version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA) programot használtam. A legtöbb vizsgálat esetében az elemszám alacsony volt ($N \leq 10$), ezért az eredmények statisztikai értékelésére nem-parametrikus teszteket (Kruskal-Wallis próba és Dunn-teszt) alkalmaztam. A kontroll (friss sperma) progresszív motilitás értékeit kihagytam a statisztikai elemzésekből, azonban referencia értéként minden esetben feltüntettem a kontroll motilitás értékeket.

4. EREDMÉNYEK

Összesen négy családba tartozó nyolc halfaj esetén sikerült kidolgoznom sperma-vitrifikációs módszereket (4. táblázat). Az optimális sperma-vitrifikációs módszerek között fajonként jelentős eltéréseket találtam a védőanyag típusa és koncentrációja, valamint az optimális hűtőmedium és hígítási arány terén egyaránt. Két tényezőben egyeztek meg az optimális protokollok az összes vizsgált faj esetében: az első pont a hűtés térfogata, ami kizárólag 10 mikroliter alatt volt megfelelő a vitrifikációhoz (ezen módszerek közül is a legkisebb töltési kapacitású Cryotop bizonyult a leghatékonyabbnak). A másik közös pont a védőanyag-koncentráció, amelynek tekintetében minden esetben 30-40% között mértem a legjobb eredményeket. Megfigyeléseim alapján 30% védőanyag koncentráció alatt a módszer nem eredményez teljes vitrifikációt (ezekben az esetekben jégkristály-képződés volt megfigyelhető, a minták nitrogénbe helyezve kifehéredtek), 40% védőanyag koncentráció felett pedig a citotoxikus hatás volt jelentős (a vitrifikációs teljes volt, azonban a felolvasztás utáni minőségjelző paraméterek szignifikánsan csökkentek). A hígítási arány, védőanyag összetétel illetve hűtőmedium tekintetében a mélyhűtési protokolloknál leírt fajra jellemző különbségeket tapasztaltam.

A kísérletek során tesztelt védőanyagokat halspermán végzett akut toxicitási vizsgálatok alapján választottam ki (Cuevas-Urbe et al., 2011a). A különböző krioprotektánsok kedvező tulajdonságait kombinálással fokoztam: a metanol könnyen áthatol a membránokon, és viszonylagosan alacsony a toxicitása (Ali & Shelton, 2007), a metil-glikol és a propilén-glikol elősegíti az üvegszerű szerkezet kialakulását (Robles et al., 2005; Weiss et al., 2010).

A progresszív motilitás értékek minden esetben szignifikánsan csökkentek a friss kontroll értékhez képest.

4. Táblázat: A különböző fajok esetében a legmagasabb, vitrifikációt követő felolvasztás után mért progresszív motilitás értékeket eredményező protokollok összefoglalása.

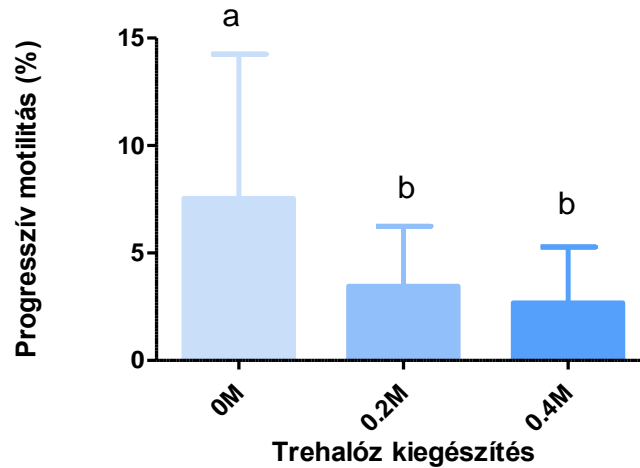
Család	Faj	Prog. mot.	Termékenyülés	Hígítási arány	Hűtőmedium	Védőanyag
	Pénzes pér (<i>Thymallus thymallus</i>)	8,75±6,25%	13,1±11,7%	1:1	Pér hígító	15% MOH + 15% PG
Lazacfélék (<i>Salmonidae</i>)	Márványpisztráng (<i>Salmo marmoratus</i>)	8,6±0,7%	-	1:1	Pér hígító	20% MOH + 20% PG
	Sebes pisztráng (<i>Salmo trutta</i>)	13,2±5,8%	-	1:1	Pér hígító	20% MOH + 20% PG
	Zebraadánió (<i>Danio rerio</i>)	10,8±5,2%	0,7±0,3%	1:4	HBSS	15% MOH + 15% PG
Pontyfélék (<i>Cyprinidae</i>)	Ponty (<i>Cyprinus carpio</i>)	7,2±0,6%	-	1:100	Ponty szeminális plazma + pér hígító	10% MOH + 10% MTX +10% PG
	Compó (<i>Tinca tinca</i>)	3,1±0,1%	-	1:4	Pér hígító	10% MOH + 10% MTX +10% PG
Sügérfélék (<i>Percidae</i>)	Sügér (<i>Perca fluviatilis</i>)	14±1,6%	4,9±4,8%	1:5	Tanaka	15% MOH + 15% PG
Angolnafélék (<i>Anguillidae</i>)	Európai angolna (<i>Anguilla anguilla</i>)	10,3±1,7%	-	1:1	Tanaka + 0,2M trehalóz	20% MOH + 20% PG

4.1. Sperma vitrifikáció: lazacfélék

4.1.1. Pénzes pér sperma vitrifikációja

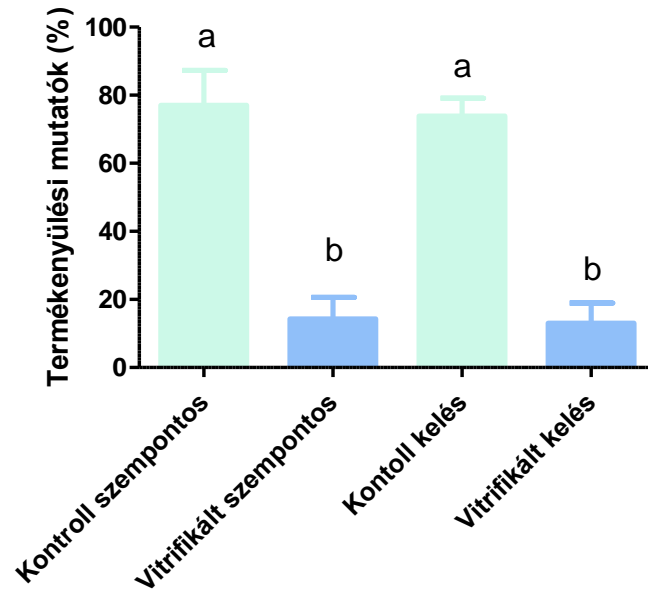
Pénzes pér fajban 30% védőanyag (15% MeOH + 15% PG) felhasználásával, 1:1 hígítási aránnyal (sperma:hűtőmedium), pér szeminális plazma hígítóval, Cryotop eszközön vitrifikálva $8,75 \pm 6,25$ % felolvasztás utáni progresszív motilitást mértem (friss kontroll: $95,5 \pm 0,5$ %).

A trehalóz kiegészítés a péré sperma esetében szignifikánsan csökkentette a felolvasztás utáni motilitás értékeket (23. ábra).



23. ábra: Különböző koncentrációjú trehalóz kiegészítések hatása a vitrifikált pénzes pér sperma felolvasztást követően mért motilitás értékeire ($N=5$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$).

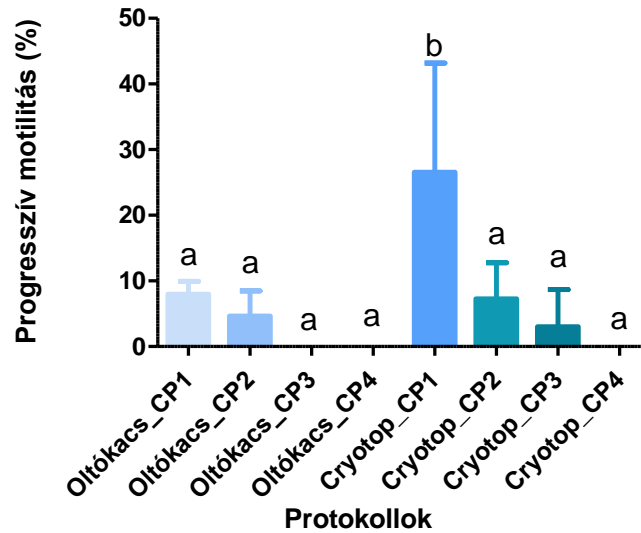
A vitrifikált pérépermával termékenyítve a szempontos stádiumig fejlődő embriók aránya $14,3\pm 12,7\%$ volt (kontroll: $77,1\pm 9\%$), a kelésig az embriók $13,1\pm 11,7\%$ jutott el (kontroll: $73,9\pm 10,4\%$). A kísérleti csoportok termékenyülési értékei (szempontos stádiumig fejlődés és kelés aránya) szignifikánsan alacsonyabbak voltak, mint a kontroll csoportban mért paraméterek (24. ábra), azonban a vitrifikált csoportban nem történt szignifikáns csökkenés a szempontos stádium és a kelés között.



24. ábra: Termékenyülési mutatók vitrifikált pénzes pér spermával történő termékenyítés után, szempontos ikra illetve kelési százalék tekintetében ($N=5$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$).

4.1.2. Márványpisztráng sperma vitrifikációja

Márványpisztráng fajban 40% védőanyag (20% MeOH + 20% PG) felhasználásával, 1:1 hígítási aránnyal (sperma:hűtőmedium), pér hígítóval, Cyrotop eszközön vitrifikálva $8,6 \pm 0,7$ % felolvasztás utáni progresszív motilitást mértem (friss kontroll: $78,4 \pm 23,3$ %). Ezzel a vitrifikációs módszerrel szignifikánsan magasabb volt a sperma felolvasztás utáni motilitása, mint a többi módszer használatával (25. ábra).



25. ábra: Márványpisztráng sperma különböző protokollokkal történő vitrifikációját követő felolvasztás után mért progresszív motilitás értékek ($N=6$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$).

4.1.3. Sebes pisztráng sperma vitrifikációja

Sebes pisztráng fajban 40% védőanyag (20% MeOH + 20% PG) felhasználásával, 1:1 hígítási aránnyal (sperma:hűtőmedium), pér hígítóval, Cryotop eszközön vitrifikálva $13,2 \pm 5,8$ % felolvasztás utáni progresszív motilitást mértem ($N=6$, friss kontroll: $84,4 \pm 9,7$ %).

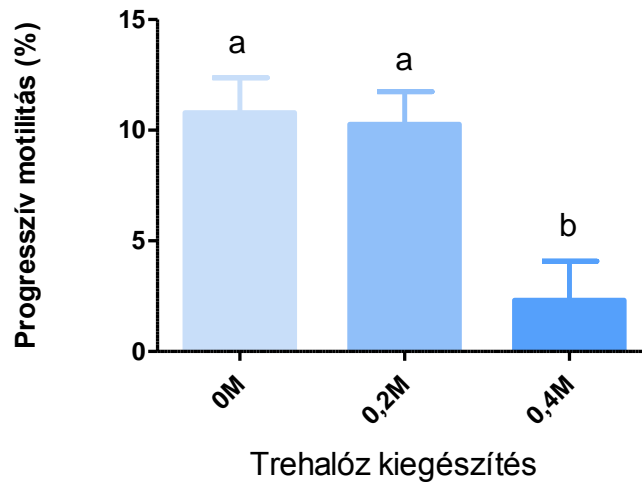
A vitrifikált spermával termékenyítési próbát végeztünk (5 Cryotop / 100 ikraszem, $N=6$), azonban nem találtunk szempontos stádiumig fejlődő embriót a kísérleti csoportban (kontroll: $37 \pm 5,2$ %).

4.2. Sperma vitrifikáció: pontyfélék

4.2.1. Zebradánió-sperma vitrifikációja

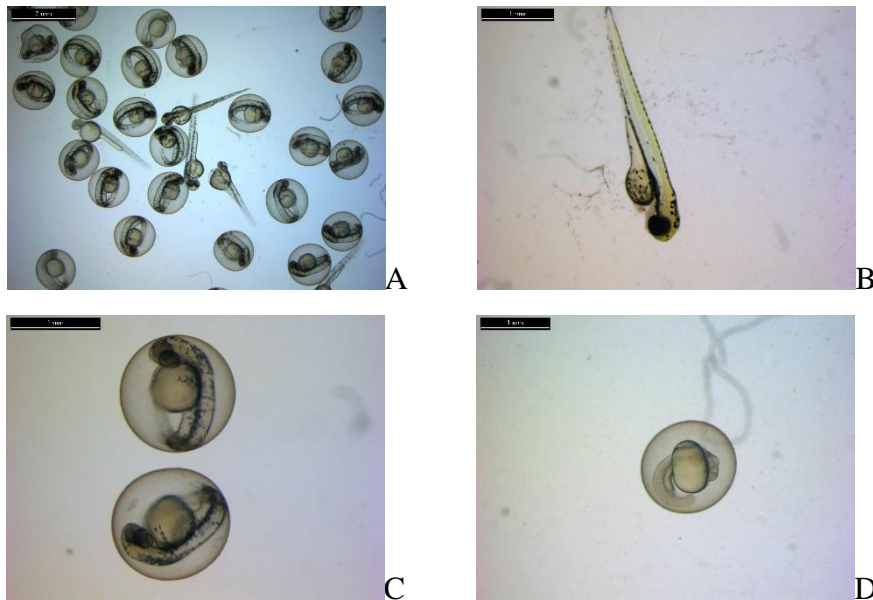
Zebradánió fajban 30% védőanyag (15% MeOH + 15% PG) felhasználásával, 1:4 hígítási aránnyal (sperma:hűtőmedium), HBSS hígítóval, Cryotop eszközön vitrifikálva $10,8 \pm 5,2$ % felolvasztás utáni progresszív motilitást mértem (friss kontroll: $84,5 \pm 8$ %). Ugyanezzel a protokollal a vitrifikált-felolvasztott mintákban SYBR-14/PI festést követően a membrán-intakt sejtek aránya $91,4 \pm 2$ % volt, mely nem különbözött szignifikánsan a kontrolltól ($96 \pm 1,4$ %).

A 0,2 M-os trehalóz kiegészítésnek nem volt szignifikáns hatása a felolvasztás utáni motilitás értékekre, 0,4 M trehalóz kiegészítésnél pedig szignifikánsan csökkent a vitrifikált zebradánió sperma motilitása (26. ábra).



26. ábra: Különböző koncentrációjú trehalóz kiegészítések hatása a vitrifikált zebradánió sperma felolvasztást követően mért motilitás értékeire ($N=12$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$).

Az optimális protokollal vitrifikált spermával termékenyítést végeztem, melynek eredményeképp az embriók $0,7\pm 0,3\%$ -a kelt ki ($N=5$, kontroll: $59,8\pm 3\%$). A kikelt embriók (27. ábra) morfológiailag nem mutattak eltérést a kontroll csoporttól.

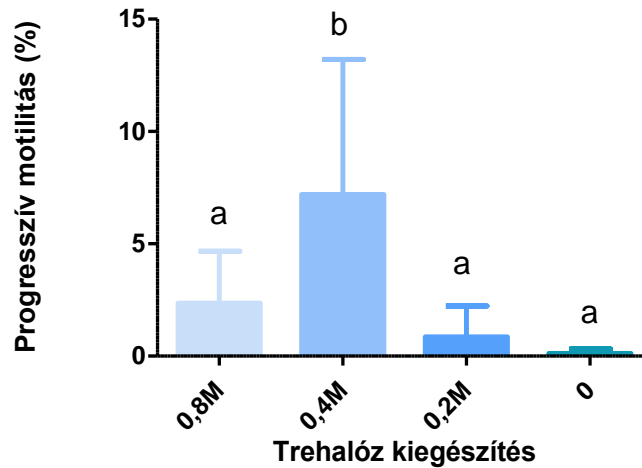


27. ábra: A vitrifikált zebradánió spermával végzett termékenyítési próbából származó fejlődő embriók képei (embriók a vitrifikált spermával termékenyített csoportból: B,C,D, embriók a friss spermával termékenyített kontroll csoportból: A).

4.2.2. Pontysperma vitrifikációja

Ponty esetében elsőként az ideális hígítási arányt kellett meghatároznom. Összehasonlítottam a mélyhűtési eljárások során használt 1:100 hígítást a más pontyféléknél használt kisebb hígítással (1:4). Az 1:100 hígítási aránnyal történő vitrifikációt követően felolvasztás után $3,4 \pm 3,2\%$ progresszív motilitást mértem, ez szignifikánsan magasabb, mint az 1:4 hígítás esetében ($0,4 \pm 0,4\%$, friss kontroll: $82,9 \pm 8,3\%$). Az eredmények alapján ponty sperma vitrifikációja során az 1:100 hígítás javasolt, mivel az ivartermék magas sejtkoncentrációja miatt kisebb hígítással nem elegendő a hűtés előtt hozzáadott védőanyag a sejtek vitrifikálódásához.

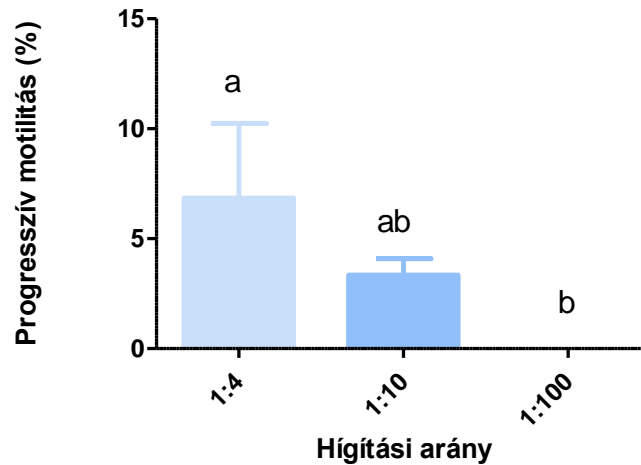
Ezután különböző koncentrációjú trehalóz kiegészítéssel próbáltam javítani a fenti módszertan (10% MeOH + 10% MG +10% PG, hűtőmedium: ponty szemínális plazma. 1:100 hígítási arány) hatékonyságát. 0,4 M trehalózzal kiegészítve, Cryotop eszközön vitrifikálva $7,2 \pm 5,8\%$ felolvasztás utáni progresszív motilitást mértem (friss kontroll: $88,5 \pm 8,9\%$). Az ennél magasabb, illetve alacsonyabb koncentrációjú trehalóz kiegészítés szignifikánsan alacsonyabb motilitás értékeket eredményezett (28. ábra).



28. ábra: Vitrifikált pontysperma felolvasztást követően mért progresszív motilitás értékei a hűtőmedium 0,8M/0,4M/0,2M/0M trehalóz kiegészítésével ($N=9$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$).

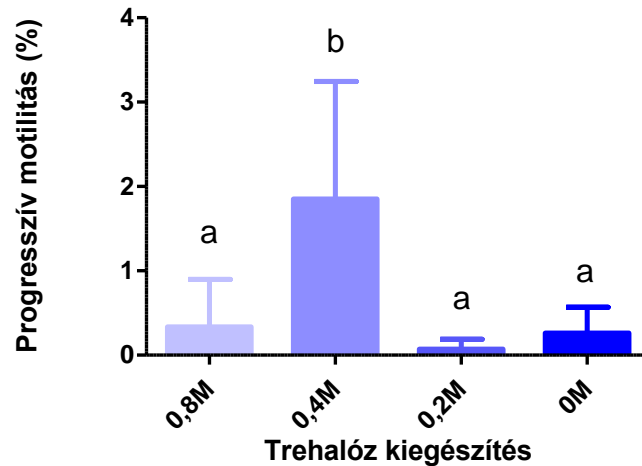
4.2.3. Compósperma vitrifikációja

Compó fajban elsőként az ideális hígítási arányt kellett meghatároznom, mivel a ponty sperma vitrifikációja során használt 1:100 hígítás nem eredményezett mozgó sejteket felolvasztás után. A vitrifikáció során 10%MeOH+10PG+10%MG védőanyagot használtam, eszközként oltókacsot. Az 1:4 hígítási arányt használva szignifikánsan magasabb motilitás értékeket mértem ($6,84\pm 3,3\%$, friss kontroll: $80,8\pm 22\%$), mint az 1:100 hígítás esetében (29. ábra).



29. ábra: Compósperma vitrifikációja során használt különböző hígítási arányok használatát követően mért felolvasztás utáni progresszív motilitás értékek ($N=10$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$).

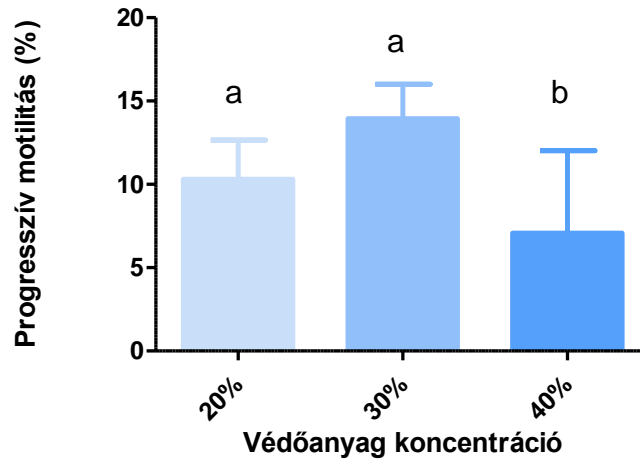
Ezt követően a hűtőmedium trehalóz kiegészítésével próbáltam növelni a felolvasztás utáni motilitás értékeket, ez esetben 4 koncentrációt (0,8 M, 0,4 M, 0,2 M, 0 M) teszteltem. A hűtőmedium 0,4 M trehalózzal történő kiegészítése esetén szignifikánsan magasabb motilitás értékeket ($1,9 \pm 1,2$ %, friss kontroll: 81 ± 28 %) mértem, mint a 0,8 M, 0,2 M és 0 M trehalóz kiegészítés esetén. Feltételezhetően 0,4 M koncentráció alatt a trehalóz nem képes kifejteni a membrán-protéktív hatását, 0,4 M koncentráció felett pedig ozmotikus hatása révén károsítja a sejteket (30. ábra).



30. ábra: Vitrifikált compósperma felolvasztást követően mért progresszív motilitás értékei a hűtőmedium 0M/0,2M/0,4M/0,8M trehalóz kiegészítésével ($N=10$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$).

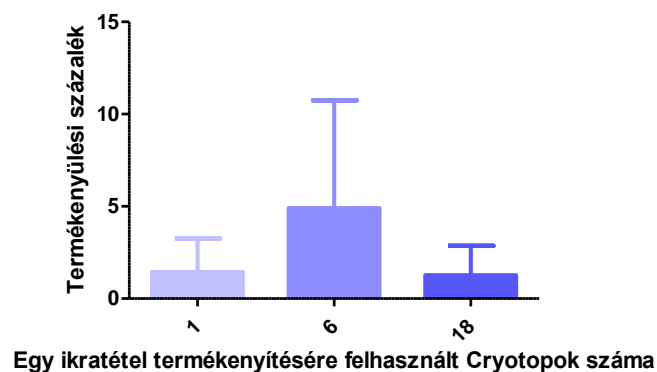
4.3. Sperma-vitrifikáció: sügérfélék

Sügér fajban 30% védőanyag (15% MeOH + 15% PG) felhasználásával, 1:5 hígítási aránnyal (módosított Tanaka hígítóban), Cryotop eszközön vitrifikálva $14 \pm 1,6\%$ felolvasztás utáni progresszív motilitást mértem (friss kontroll: $76 \pm 17\%$). A 20% és 30% védőanyag (MeOH és PG 1:1 arányú keveréke) között nem találtam szignifikáns különbséget, azonban 40% védőanyag hozzáadásakor a felolvasztás utáni progresszív motilitás szignifikánsan csökkent. A mozgás sebessége és egyenessége szintén a 40% védőanyag használatakor változott szignifikánsan (31. ábra). A kontroll (friss sperma) progresszív motilitása $76 \pm 17\%$ volt.



31. ábra: A metanol és propilénglikol 1:1 arányú keverékének különböző koncentrációkban alkalmazott hatása a sügér sperma vitrifikációt követő felolvasztás után mért motilitás értékeire ($N=10$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$).

A vitrifikált spermával történő termékenyítési teszt fejlődő embriókat eredményezett ($4,9 \pm 4,8\%$ termékenyülés, friss kontroll: $76 \pm 14,5\%$). A három különböző termékenyítésre használt spermamennyiség (1/6/18 Cryotop/100 ikraszem) között nem találtam szignifikáns különbséget (32. ábra).

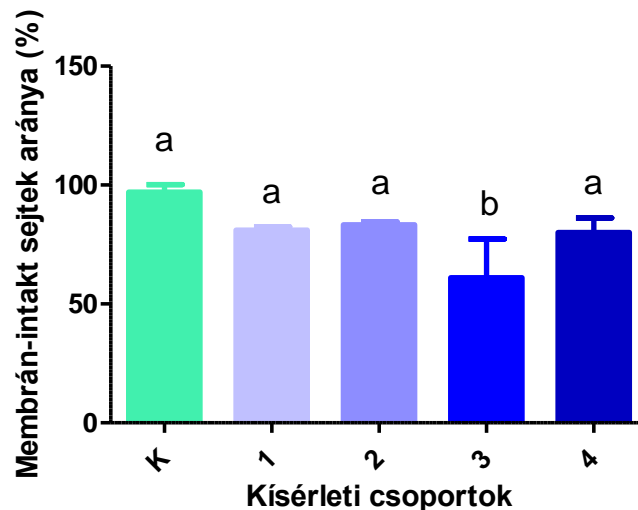


32. ábra: A vitrifikált sügér sperma különböző mennyiségű felhasználása 100 ikraszem termékenyítésére (1/6/18 Cryotop/ikratétel, $N=5$)

4.4. Sperma-vitrifikáció: angolnafélék

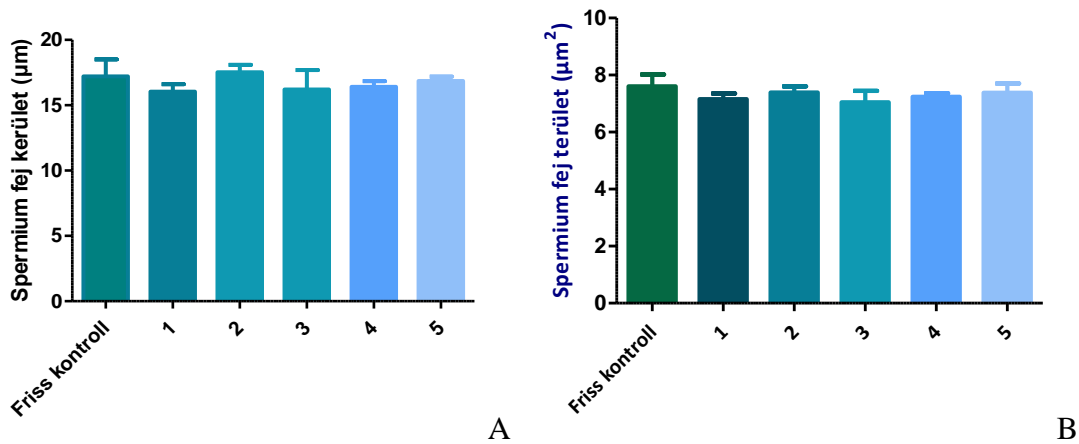
4.4.1. A spanyolországi angolnaállományon végzett vizsgálatok

Első lépésként membránfestéssel (SYBR-14/PI, Invitrogen) vizsgáltam 4 különböző sperma-vitrifikációs módszert. 50% védőanyag koncentráció felett szignifikánsan csökkent az ép membránnal rendelkező angolna-spermiumok aránya, így további vizsgálatok során 40%-nál magasabb védőanyag koncentrációt hatását nem vizsgáltam. 30% és 40% védőanyag koncentráció használatával nem csökkent szignifikánsan az életképesség a friss kontrollhoz képest (33. ábra).



33. ábra: Friss és vitrifikált-felolvasztott angolnasperma mintákban élő sejtek százalékos aránya SYBR-14/PI festést követően számolva. K=friss kontroll, 1= 10% MeOH+10% EG+ 10% PG, 2= 10% MeOH+ 10% EG+ 10% PG+10% FBS, 3= 20% MeOH+ 20% EG+ 10% PG + 10% FBS, 4= 20% FBS ($N=10$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$).

Öt különböző módszer összehasonlítása során megállapítottam, hogy nem mérhető szignifikáns különbség a friss és a vitrifikált-felolvasztott spermiumok fejének morfológiai paramétereiben (fej kerület és terület, $n=100$ /minta). Korábbi vizsgálatok alapján kijelenthető, hogy a morfológiai paraméterek korrelálnak az életképességgel, tehát ez alapján megállapíthatjuk, hogy a vizsgált vitrifikációs módszerek megfelelőek az európai angolna spermájának vitrifikálására. (34.A és 34.B ábrák).



34. ábra: A különböző protokollokkal vitrifikált angolnaspermiumok fejének kerülete (A, $N=10$) és területe (B, $N=10$). Friss kontroll; 1 - 20% védőanyag, 1:9 hígítási arány, Cryotop; 2 - 20% védőanyag, 1:9 hígítási arány, műszalma; 3 - 40% védőanyag, 1:1 hígítási arány, Cryotop; 4 - 40% védőanyag, 1:9 hígítási arány, Cryotop; 5 - 40% védőanyag, 1:9 hígítási arány, műszalma

További vizsgálatok során különböző módszereket hasonlítottam össze a felolvasztás után mért motilitás értékek alapján. A táblázat adatai szemléltetik, hogy bár a vizsgált vitrifikációs módszerek nem okozták a spermiumok morfológiai paramétereinek megváltozását, a sejtek a mozgáskéességüket csak a Cryotop-on történő vitrifikáláskor őrizték meg.

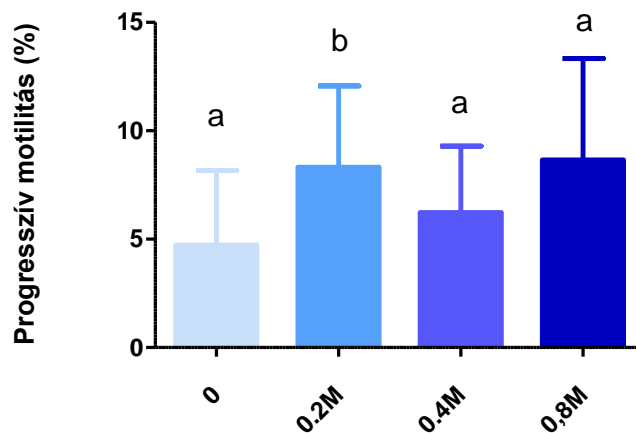
Ezt követően az eredetileg 1:9-es hígítási arányt 1:1-re csökkentettem, és így szignifikánsan magasabb motilitás értékeket mértem felolvasztást követően, azonban a műszalmában végzett vitrifikáció ezzel a hígítási aránnyal sem bizonyult eredményesnek (5. táblázat).

5. táblázat: Vitrifikált angolnasperma felolvasztást követően mért progresszív motilitás értékei ($N=10$). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p<0,05$).

Védőanyag	Hűtőeszköz	Hígítási arány	Progresszív motilitás
10% MeOH + 10% PG	Cryotop	1:9	$0,6\pm 0,49\%^a$
10% MeOH + 10% PG	műszalma	1:9	0%
10% MeOH + 10% PG + 10% EG	Cryotop	1:9	0%
10% MeOH + 10% PG + 10% EG	műszalma	1:9	0%
20% MeOH + 20% PG	Cryotop	1:9	$1,25\pm 1,64\%^a$
20% MeOH + 20% PG	műszalma	1:9	0%
20% MeOH + 20% PG	Cryotop	1:1	$5\pm 0,81\%^b$
20% MeOH + 20% PG	műszalma	1:1	0%

4.4.2. A magyarországi angolnaállományon végzett vizsgálatok

Európai angolna fajban 40% védőanyag (20% MeOH + 20% PG) felhasználásával, 1:1 hígítási aránnyal (sperma:hűtőmedium), ponty szeminális plazmát használva hígítóként 0,2 M trehalózzal kiegészítve, Cryotop eszközön vitrifikálva $10,3 \pm 1,7$ % felolvasztás utáni progresszív motilitást mértem (friss kontroll: $88,3 \pm 2,7$ %). A 0,2 M trehalózt tartalmazó hígító használatával szignifikánsan magasabb felolvasztás utáni motilitás értéket mértem, mint a többi kísérleti csoportban (35. ábra).

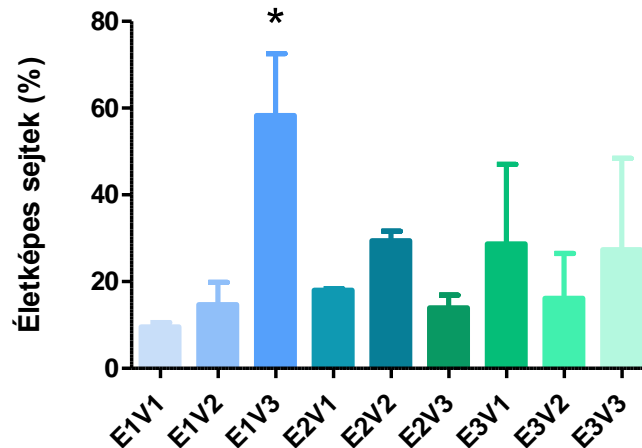


35. ábra: Vitrifikált angolna sperma felolvasztást követően mért progresszív motilitása a hűtőmedium 0 M/0,2 M/0,4 M/0,8 M trehalóz kiegészítésével (N=10). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).

4.5. Spermatozónium vitrifikáció

4.5.1. Zebradánio spermatozónium vitrifikáció

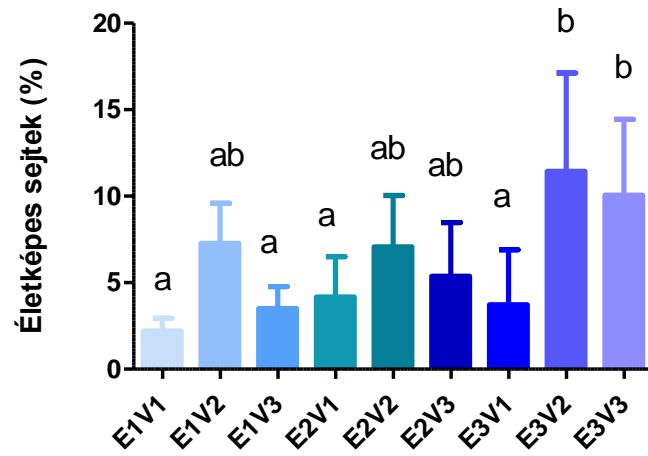
Mind a kilenc tesztelt vitrifikációs módszer különböző mértékben bizonyult alkalmasnak a spermatozóniumok megőrzésére. A legmagasabb túlélési arányt ($58,31 \pm 13,79\%$) az E1 ekvilibrációs (1,5 M MeOH + 1,5 M PG) oldat és a V3 vitrifikációs oldat (3 M PG + 3 M DMSO) használatakor mértem (36. ábra).



36. ábra: Vitrifikált zebradánio heréből izolált spermatozóniumok túlélési százaléka (N=10). A csillaggal (*) jelölt érték szignifikánsan eltér a többi értéktől ($p < 0,05$).

4.5.2. Ponty spermatozónium vitrifikáció

Ponty here vitrifikációját követően a spermatozóniumok túlélési aránya alacsonyabb volt a zebradánio esetében kapott értékeknél. Ponty spermatozóniumok vitrifikálására az E3 ekvilibrációs oldat kombinálva a V2 és V3 vitrifikációs oldatokkal eredményezte a legmagasabb túlélési arányt (E3V2: $11,43 \pm 5,2\%$, E3V3: $10,05 \pm 4\%$, 37. ábra).



37. ábra: Vitrikált pontyheréből izolált spermatogóniumok túlélési százaléka (N=10). Az eltérő betűk szignifikáns különbséget jelölnek ($p < 0,05$).

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1. Halsperma-vitrifikáció

A halak spermájának mélyhűtése során probléma az általánosan használt eszközök (műszalmák) relatíve nagy hűtési térfogata (0,25 ml – 5 ml), mellyel a kis testméretű; néhány mikroliter térfogatú (Yang & Tiersch, 2009) spermát termelő halak ivartermékét egyedileg, in vitro génmegőrzés céljából nem lehet mélyhűteni. A nagyobb testméretű gazdasági halfajok esetében problémát jelent az egységes mélyhűtési módszertan hiánya, valamint az, hogy a halgazdasági gyakorlatban a mélyhűtött spermával történő termékenyítés igen ritka. Az ekvilibrum mélyhűtés során keletkező jégkristályok károsítják az ivarsejteket, ami rontja a termékenyülési eredményeket. A fent említett problémákra kínál megoldást a sperma vitrifikációja.

Kísérleteim eredményeképpen lehetővé vált számos olyan halfaj spermájának vitrifikációja, amelyekről korábban nem állt rendelkezésre információ. Általánosságban megállapítható, hogy a vizsgált hűtőeszközök közül (műszalma, oltókacs, Cryotop) a Cryotop bizonyult a legeredményesebbnek. A vitrifikációhoz szükséges gyors hűtési sebesség eléréséhez fontos a vitrifikált oldat térfogatának minimalizálása (Dinnyes et al., 2007). A műszalmák esetében a legkisebb térfogatú szalma (0,25 ml) is túl nagynek bizonyult a kellőképpen gyors hőátadáshoz, és kristályosodást eredményezett a vitrifikáció és a felolvasztás során is. Ez a tapasztalat ellentmond Varela és munkatársai cikkének, melyben 10% DMSO védőanyag használatával, 0,25 ml-es műszalmában sikeresen vitrifikálták gyümölcsevő piranha spermáját (Varela et al., 2015). Vizsgálataim alapján 10% DMSO sokkal kisebb hűtési térfogatnál gátolja a jégkristályok képződését, és 0,25 ml-es műszalmában magasabb (40-50%) védőanyag koncentrációval sem történik vitrifikáció. Eredményeim alapján halsperma vitrifikációjára alkalmasnak két eszköz bizonyult: a műanyag oltókacs, illetve a Cryotop. Mindkét eszköz alkalmas kis térfogatok hűtésére és gyors olvasztására, egyedileg jelölhetőek, azonban a Cryotop használatakor szignifikánsan magasabb felolvasztást követő motilitás értékeket mértem, mint az oltókacson vitrifikált mintáknál. A jelenség oka feltehetően a két eszköz térfogata közötti különbségen alapszik: az oltókacson (10 µl) négyszer annyi folyadék helyezkedik el, mint a Cryotopon (2,5 µl), ebből adódóan a hőátadás lassabb az oltókacs esetében, ami a felolvasztáskor rekrisztallizációt eredményezhet. A kis hűtési térfogattal előidézhető gyors hőátadás azért kulcsfontosságú, mert amennyiben a vitrifikáció nem teljes, csak részleges -intracellulárisan nem, azonban extracellulárisan keletkeznek jégkristályok-, ennek következtében a sejtek károsodhatnak (Vajta & Nagy, 2006).

A vitrifikált sperma felolvasztást követően mért motilitás értékei a legtöbb faj esetében alacsonyabbak voltak, mint a hagyományos mélyhűtéssel elérhető értékek. Ezt a tendenciát írták le a témában publikáló más szerzők is (Cuevas-Urbe et al., 2011a, 2011b; Figueroa et al., 2013). Ennek oka az, hogy a vitrifikációt követően a spermiumok mozgása többnyire inkább lokális (rezgésszerű), mint progresszív (Cuevas-Urbe et al., 2011b). Ennek magyarázata egyelőre nem tisztázott, de feltételezhetően az oldat magas viszkozitása okozza a károsodást. Több faj esetében termékenyülést is leírtam a vitrifikált spermával történő termékenyítést követően, ez is bizonyítja azt, hogy alacsony motilitás értékek mellett is hatékonyan megőrizhető a genetikai információ.

A vitrifikációs módszerek hatékonyságát a motilitás értékek mellett az angolna sperma morfológiai elemzésének eredményei is bizonyítják, mivel a vitrifikált-felolvasztott spermiumok fejének kerülete és területe nem csökkent szignifikánsan a friss sperma értékeihez képest. Angolna fajon számos kutatás vizsgálta a spermium fejének morfológiáját (Asturiano et al., 2006; Marco-Jiménez et al., 2006a), valamint a mélyhűtési eljárások morfológiai paramétereit befolyásoló hatását (Peñaranda et al., 2009). Az ozmotikus stressz következményeképp jelentős morfológiai változásokat figyeltek meg európai angolna spermáján (Asturiano et al., 2007). Az elhalt spermiumok feje jelentősebb méret csökkenésen megy keresztül, mint az élőké (Peñaranda et al., 2009), ennek ismeretében az általam kidolgozott vitrifikációs protokollok megfelelőek angolna esetében.

A fluoreszcens membránintegritás vizsgálatok eredményei azt mutatták, hogy a vitrifikált zebradánió- és angolna sperma életképessége nem különbözött szignifikánsan felolvasztás után a kontroll értékektől. Ezzel szemben a motilitás értékek, valamint zebradánió esetében a termékenyülési értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak vitrifikációt követően a kontroll értékeknél. A halspermiumok membránja nem feltétlenül érzékeny a vitrifikációra: szivárványos pisztráng esetében a membránintegritás nem csökkent szignifikánsan még abban az esetben sem, amikor semmilyen védőanyagot nem használtak a sperma vitrifikációja során (Merino et al., 2011). A szerző véleménye szerint ez azért lehetséges, mivel a vitrifikáció során nem képződnek jégkristályok, amelyek károsíthatnák a sejtek membránjait. Ugyanebben a cikkben azt is leírták, hogy bár a membránintegritás értékeit nem csökkentette a vitrifikáció, ezzel szemben a JC-1 festéssel vizsgált mitokondriális membránpotenciál 68%-ról 36%-ra csökkent. Ez a változás pozitív korrelációt mutat a vitrifikált spermával végzett termékenyítési próba eredményével, ami a kontroll 62%-hoz képest csak 32% termékenyülést eredményezett. Ezen eredmények alapján feltételezhető, hogy a vitrifikáció során a mitokondriumok károsodása okozza a motilitás csökkenését.

A felolvasztás után mért alacsony motilitás értékek egy további lehetséges oka, hogy a mélyhűtés és felolvasztás a spermiumok spontán aktivációját okozza néhány fajban: megfigyelték ezt a jelenséget ponty és sügér fajokban, ezzel szemben nem jellemző szivárványos pisztráng, csuka és kecsge fajokra (Dzyuba et al., 2010). Ponty fajban a spontán aktiváció hatását vizsgálták a felolvasztás utáni idő múlásával: 25 másodperc és 10 perc között szignifikánsan csökkent az ATP szint: 46 nmol ATP/10⁹-ről 10 nmol ATP/10⁹-re (Boryshpolets et al., 2009). Az ATP tartalom és motilitás kapcsolatát biolumineszcencia méréssel vizsgálták ponty spermán: immobilizáló oldatban a mozdulatlan spermiumok ATP tartalma magas maradt, ezzel szemben az aktivált, mozgó spermiumok ATP tartalma csökkent. A mitokondriális légzés gátlásával a spermiumok ATP tartalma szintén csökkent, a hígító oldat típusától (aktiváló vagy immobilizáló) függetlenül. Az egyszer már aktivált spermiumokat 10 percre visszahelyezve egy magas ozmolalitású (immobilizáló) oldatba a sejtek visszanyerték a kezdeti ATP tartalom 90%-át és mozgásképességüket egyaránt. Ez alapján kijelenthető, hogy ponty sperma esetében a motilitás a mitokondriális légzés által termelt ATP-től függ, tehát *de novo* ATP szintézis történik (Perchec et al., 1995). Ezeket az információkat figyelembe véve érdemes lenne halfajonként külön-külön megvizsgálni a spontán aktiváció jelenségét, valamint mérni a mitokondriális membránpotenciál változásait a motilitás értékekkel együtt.

Az eredményeim alapján kijelenthető, hogy a halsperma optimális vitrifikációjához kis térfogat (néhány mikroliter) szükséges. A legjobb eredményeket a Cryotop eszközön történő 2 mikroliteres mennyiség vitrifikálásával értem el, emellett alacsonyabb hatékonyságú vitrifikációt kiviteleztem oltókacson. Ezzel szemben a műszalmás vitrifikáció egyetlen vizsgált fajban sem eredményezett mozgó spermiumokat a felolvasztás után. Cuevas-Uribe és munkatársai membránintegritás értékekkel vetették össze a műszalmás és az oltókacsos vitrifikációt, és az eredmények azt mutatták, hogy az intakt membránú spermiumok aránya több, mint kétszerese oltókacson történő vitrifikációt követően, mint azonos protokollal történő műszalmás vitrifikáció után (Cuevas-Uribe et al., 2011a). A hűtőeszköz 0.07 cm-es vastagsága esetén a számított hűtési sebesség körülbelül 720.000 K/perc (Isachenko et al., 2003), mely elég gyors ahhoz, hogy meggátolja a jégkristályok keletkezését.

A sikeres vitrifikációhoz elegendő védőanyag koncentráció toxikus és hipertóniás hatással károsítja a sejteket (Yavin & Arav, 2007). A halsperma képes tolerálni a magas védőanyag koncentrációt, amennyiben az különböző krioprotektánsok megfelelő kombinációjából adódik össze (Cuevas-Uribe et al., 2011a, 2011b), valamint a toxicitás csökkenthető az ekvilibrációs idő minimumra csökkentésével. Ez a gyakorlatban azt jelenti, hogy miután a spermát tartalmazó oldathoz hozzáadjuk a védőanyagokat, 1 percen belül a cseppfolyós nitrogénbe kell helyezni a

mintákat. A különböző védőanyagok kombinálásával a vitrifikációs hatékonyságuk növelhető, míg a toxicitásuk csökkent (Ali & Shelton, 2007). Ezen okokból kísérleteim során az ekvibrációs időt minden esetben 1 perc alatt tartottam, és minimum 2 védőanyag kombinációját használtam a tesztek során. Eredményeim azt mutatják, hogy 40%-os koncentráció felett a védőanyagok toxicitása túl magas, 30% alatt pedig a jégkristály képződés folyamata nem teljesen gátolt. A védőanyag-mentes vitrifikáció egyetlen faj esetében sem bizonyult hatékonynak, ezt más fajok esetében is megfigyelték (Cuevas-Urbe et al., 2013, 2011a). Ezzel szemben néhány cikkben sikeres védőanyag-mentes vitrifikációt közöltek (Merino et al., 2012, 2011).

A hígító oldat trehalóz kiegészítésével szignifikánsan magasabb felolvasztás utáni motilitás értékeket mértem ponty, compó és angolna sperma vitrifikációja esetében. Ezzel szemben a trehalóz kiegészítés pozitív hatása nem volt megfigyelhető zebradánió és pénzes pér fajok spermájának vitrifikációjakor (6. táblázat). Számos szerző írta le a trehalóz kedvező hatását hal ivarsejtek mélyhűtésekor (Judycka et al., 2016; Koh et al., 2010; Liu et al., 2015; Yoshizaki & Lee, 2016), azonban más vizsgálatokban nem bizonyult hatékonyabb védőanyagként a trehalóz egyéb cukrokkal (pl. szacharóz) összehasonlítva (Somfai et al., 2015).

6. Táblázat: Trehalóz kiegészítés hatása a vitrifikált sperma felolvasztás után mért progresszív motilitás értékeire (+: pozitív hatás, -: negatív hatás, o: nincs hatás).

Vizsgált faj	Trehalóz hatása	Hatékony koncentráció
Pénzes pér	(-)	-
Zebradánió	(o)	-
Ponty	(+)	0,4 M
Compó	(+)	0,4 M
Angolna	(+)	0,2 M

A vitrifikáció sikerességének egy másik kritikus pontja az olvasztás, amikor rekrisztallizáció történhet. Kísérleteimben a legjobb eredményeket akkor kaptam, amikor a vitrifikált spermát közvetlenül az aktiváló oldatban olvasztottam fel, a cseppfolyós nitrogénből való kivételt követően, 1 másodpercen belül. Egy korábbi tanulmányban leírták, hogy mexikói kardfalkúhal sperma esetében az olvasztó médium hőmérsékletének változtatása (24°C és 37°C) nem befolyásolta a kapott eredményt (Cuevas-Urbe et al., 2011b), így feltételezhető, hogy mindkét hőmérséklet alkalmas az olvasztás során fellépő jégkristály-képződés (devitifikáció vagy rekrisztallizáció) megakadályozására. Ez az állítás azonban csak halsperma esetében bizonyul igaznak, mivel egér petesejtek vitrifikációja után lézer-indukált ultragyors olvasztással javítani

tudták a túlélő sejtek arányát (Jin et al., 2014). Egér petesejtek és embriók vitrifikációjának vizsgálata során megállapították, hogy a rekrisztallizáció jelensége miatt az olvasztás sebessége akár fontosabb is lehet, mint a hűtési sebesség (Mazur & Paredes, 2016; Seki & Mazur, 2011).

További kérdés a különböző (lassú és ultragyors) mélyhűtési eljárások szerepe az epigenetikai szabályozásban. Eltérő mértékű, génműködést befolyásoló változásokat, többek között a DNS metilációs- és a hisztonszerkezet acetilációs mintázatának megváltozását idézhetik elő a különböző hűtési protokollok. Az epigenom; azaz a sejt epigenetikai tényezőinek összességének változása génexpressziós változásokat eredményezhet. Zebradánió ősvarsejtek mélyhűtése után a transzkripció szintjének csökkenését, valamint a hősokk-fehérjék megnövekedett szintjét figyelték meg (Riesco & Robles, 2013). Egy sertés sejteken végzett vizsgálat eredményei alapján az epigenetikában fontos szerepet játszó gének expressziós szintjének megváltozása elkerülhető megfelelő védőanyagok alkalmazásával (Zeng et al., 2014). Vitrifikált nyülembriók OCT4 promóter régióját vizsgálva nem találtak szignifikáns változást sem metiláltsági szint, sem génexpresszió terén a vitrifikált és a kontroll embriók között (Saenz-de-Juano et al., 2014). Ezzel szemben szarvasmarha embriók vitrifikációja után jelentős epigenetikai változásokat figyeltek meg: a metiláltság szintje csökkent, és bizonyos gének expressziós szintje is változott (Chen et al., 2015), egér blasztociszták vitrifikációja után megváltozott metilációs szintet írtak le (Bakhtari et al., 2014).

5.2. Hereszövet vitrifikáció

A hereszövetek mélyhűtve tárolásával, majd a felolvasztott szövetből történő spermatogonium izolálásával és nőivarú steril recipiensbe való beültetésével reprodukálható a női ivar, ezáltal veszélyeztetett populációk helyreállíthatóak akkor is, ha már nincs fellelhető nőivarú egyede a fajnak.

Az akupunktúrás tűn történő szövet vitrifikációt (Liu et al., 2012; Xiao et al., 2010) erre a célra alkalmasnak találtam zebradánió és ponty fajokban. A tük egyedileg jelölhetőek, valamint kriocsővekben vagy sínekre rögzített gobletekben tárolhatóak felolvasztásig. A vitrifikációt követően sikeresen izoláltam spermatogoniumokat ponty és zebradánió faj esetében egyaránt.

A spermatogoniumok vitrifikációjával megőrizhetővé válik mindkét ivar genomja, így kiváltható a nem mélyhűthető hal ikra és embrió megőrzése (Robles et al., 2009). Az utóbbi években különböző halfajokban sikeresen alkalmaztak vitrifikációs protokollokat ősvarsejtek

megőrzése során (Higaki et al., 2013a, 2010, 2009; Kawakami et al., 2012). Egy 2017-ben megjelent cikkben medaka teljes hereszövet sikeres vitrifikációját írták le (Seki et al., 2017). Ugyanez a japán kutatócsoport korábban teljes hal védőanyagmentes mélyhűtése után izolált sikeresen élő ősvarsejteket kiolvasztást követően a hal ivarszervéből (S. Lee et al., 2015; Yoshizaki and Lee, 2016), majd az izolált sejteket steril recipiens lazacba ültetve beépültek és osztódtak, a recipiensek a donor hal ivarsejtjeit termelte. Az így kapott ikra és sperma segítségével donor eredetű utódokat állítottak elő, ezáltal bizonyították, hogy ez a módszer sikeresen alkalmazható veszélyeztetett fajok génmegőrzésére.

5.3. Javaslatok

Javaslom a Cryotop hűtőeszköz használatát halsperma vitrifikációjára, mivel vizsgálataim eredményei alapján ez az eszköz a legalkalmasabb a halsperma ultragyors mélyhűtésére.

Javaslom a vitrifikációt zebradánió sperma megőrzésére, mivel a faj kis testméretből adódóan más – nagyobb hűtési térfogatot igénylő – hűtési eljárásokkal nem kivitelezhető az egyedi sperma krioprezervációja.

Javaslom a hereszövet vitrifikációt zebradánió és ponty génmegőrzésére, mivel ezzel a módszerrel a nőivar is reprodukálható, így áthidalható a halikra mélyhűtésének problémája.

Javaslom a trehalóz, mint védőanyag használatát az alábbi fajok spermájának vitrifikációjához: ponty, compó, európai angolna, mivel ezen fajok esetében a vitrifikációt követően a felolvasztott sperma motilitására pozitív hatással volt a trehalóz kiegészítés.

6. Új tudományos eredmények

1. Bebizonyítottam, hogy a Cryotop mint hűtőeszköz eredményesen használható különböző halfajok spermájának vitrifikációja során.
2. Elsőként sikerült sperma vitrifikációs eljárásokat kidolgoznom nyolc halfaj: pénzes pér, sebes pisztráng, márványpisztráng, ponty, compó, zebradánió, csapó sügér, európai angolna esetében, a módszerek hatékonyságát három faj esetében (zebradánió, csapó sügér és pénzes pér) a termékenyítési kísérletek is bizonyították.
3. Megállapítom, hogy az általam leírt vitrifikációs eljárások alkalmazásával az európai angolna spermiumainak morfológiai paraméterei nem változnak szignifikánsan.
4. Hereszövet vitrifikációs eljárásokat dolgoztam ki ponty és zebradánió fajok esetében.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A génmegőrzés szerepe napjainkban növekvő tendenciát mutat, mivel a természetben élő fajok diverzitása csökken a humán tényezők hatására. A génmegőrzés egyik lehetséges formája az *ex situ in vitro* génbankok létrehozása. Halak esetében az *in vitro* génbankok létrehozásánál problémát jelent, hogy a halakra és embrió nem mélyhűthető, csupán a sperma. Ilyen módon csak a hímivar genetikai információja őrizhető meg, ez nem elégséges egy esetlegesen kihalt faj reprodukálásához. Erre a problémára megoldás lehet a spermatogóniumok mélyhűtése, melyek steril recipiensbe ültetve a recipiens ivarától függően képesek mindkét ivar irányába differenciálódni, így a recipiens egyed a donor faj spermáját vagy ikráját termeli. Ezzel a módszerrel áthidalható az ikramélyhűtés problémája, és a mélyhűtött spermatogóniumok beültetésével akár teljes kipusztulás után is reprodukálható lenne egy adott faj.

A halak esetében számos faj spermájának mélyhűtési módszereit dolgozták már ki, emellett az utóbbi években néhány halfaj esetében sperma vitrifikációs módszereket is közöltek. Kutatásaim célja fajspecifikus sperma vitrifikációs protokollok kidolgozása volt az alábbi – más szerzők által korábban a sperma vitrifikáció tárgykörében nem vizsgált - halfajok esetében: pénzes pér, sebes pisztráng, márványpisztráng, ponty, compó, zebradánió, csapósüger, európai angolna.

A sperma vitrifikációs módszerek értékelésére az alábbi végpontokat vizsgáltam a vitrifikált-felolvasztott spermán: progresszív motilitás (CASA-val mérve), életképesség, morfometriai paraméterek (ASMA-val mérve), termékenyítő képesség. A sperma vitrifikációs kutatásokkal párhuzamosan spermatogónium (hereszövet) vitrifikációs protokollokat is teszteltem zebradánió és ponty fajokban. A spermatogónium vitrifikációs módszerek eredményességét tripán-kék membránintegritás festéssel vizsgáltam.

A lazacfélékben (pénzes pér, sebes pisztráng, márványpisztráng) végzett sperma vitrifikációs kísérleteim során kidolgoztam a vizsgált fajok számára optimális módszertant. Az optimális hűtőeszköznek minden lazacféle esetében a Cryotop bizonyult, 1:1 hígítási aránnyal, metanol és propilénlikol 1:1 arányú keverékének 30-40%-os hozzáadásával. Szivárványos pisztráng esetében más szerzők közöltek vitrifikációs protokollokat (Andreev et al., 2009; Figueroa et al., 2013; Merino et al., 2011), azonban ezek mindegyike nagyon alacsony (10% alatti) védőanyag koncentrációt írt le. Ilyen alacsony védőanyag koncentrációk használatakor saját vizsgálataim során nem gátlódott a jégkristály képződés, ez pedig a sejtek motilitásának elvesztéséhez vezetett. Az említett szerzők által leírt vizsgálatokban valószínűleg nem tényleges vitrifikációra került sor

(ezt támasztja alá az általuk használt viszonylag nagy hűtési térfogat is), hanem egy ultragyors fagyasztásra.

A pontyfélékben (ponty, compó, zebradánió) egymástól jelentősen eltérő módszerek bizonyultak eredményesnek. A három optimális módszer eltér egymástól a hűtőmedium és a hígítási arány esetében egyaránt. Ennek oka a pontyfélék családjának sokféleségében kereshető. Ponty és compó fajokban 0,4M trehalóz kiegészítéssel szignifikánsan magasabb volt a felolvasztás utáni motilitás, mint trehalóz kiegészítés nélkül ($p < 0,05$), azonban zebradánió esetében ez a kedvező hatás nem volt megfigyelhető.

Csapósünger esetében az általam kidolgozott vitrifikációs protokollt követően végzett termékenyítési teszt kikelő lárvákat eredményezett. Ez alapján kijelenthető, hogy a módszer alternatívaként használható sünger hímivarsejtek génmegőrzésére.

Az angolnafélék családjába tartozó európai angolna esetében bizonyítottam az ozmoprotektánsként használt trehalóz pozitív hatását. Megvizsgáltam a spermiumok fejének morfológiai változásait különböző protokollok használatával, és kiválasztottam azokat a módszereket, amelyek nem vezetnek a sejtek morfológiai paramétereinek megváltozásához.

A védőanyagmentes (intracelluláris védőanyag használata nélküli) vitrifikációt minden vizsgált faj esetében teszteltem, azonban a módszer egyetlen esetben sem eredményezett mozgó sejteket felolvasztás után.

A trehalóz védőanyagként történő felhasználásával a vizsgált öt fajtól három faj esetében (ponty, compó, angolna) sikerült növelni a felolvasztás után mért progresszív motilitás értékeket, míg két faj esetében a trehalóz kiegészítés hatása negatív vagy semleges volt (pénzes pér, zebradánió). Ez alapján kijelenthetjük, hogy a trehalóz hatása fajonként eltérő, melynek oka feltehetően a különböző fajok eltérő toleranciája az ozmotikus viszonyok változásaira.

A hereszövet vitrifikáció alkalmas módszernek bizonyult zebradánió és ponty génmegőrzésére. A spermatogóniumok életképességét felolvasztást követően festéssel vizsgálva igazoltuk.

A vizsgált *in vitro* hal génmegőrzési módszerek közül nyolc halfaj esetében hatékony sperma vitrifikációs módszereket sikerült kidolgoznom. Emellett hereszövet vitrifikációs módszereket dolgoztam ki sikeresen két halfaj esetében.

8. SUMMARY

Nowadays the role of gene preservation shows an increasing trend since the diversity of animal species living in the wild declines due to human factors. One possibility for gene preservation is the creation of *ex situ in vitro* gene banks. In case of fish species there are some problems with the creation of *in vitro* gene banks, such as that fish eggs and embryos do not tolerate cryopreservation, only sperm can be cryopreserved. In this manner only the genetic material of the males can be preserved, and it is not sufficient to restore any possibly extinct species. Cryopreservation of fish spermatogonia can be a solution for this problem, due to following the transplantation into a sterile recipient, these cells are able to differentiate into both sexes (depending on the sex of the recipient), thus the recipient fish is going to produce the sperm or eggs of the donor species. With this method, the problem of the non-cryopreservable fish eggs and embryos can be overcome, and with the transplantation of the cryopreserved spermatogonia extinct species can be reproduced.

In case of fish, sperm cryopreservation protocols had been carried out in numerous species, beside this in the recent years sperm vitrification protocols were published in some species. The aim of my studies was to develop species-specific sperm vitrification protocols in the following species (which had not been investigated previously by other authors): grayling, rainbow trout, brown trout, marble trout, common carp, tench, zebrafish, perch, European eel.

To evaluate the effectiveness of the vitrification protocols, the following parameters were examined in vitrified-thawed sperm: progressive motility (measured with CASA), viability, morphometrical parameters (measured with ASMA), fertilizing capacity. In parallel with the sperm vitrification studies, spermatogonia (testicular tissue) vitrification protocols had been tested in zebrafish and carp. The effectiveness of the spermatogonia vitrification was evaluated with trypan blue membrane staining.

In the Salmonidae family (grayling, brown trout, marble trout) optimal species-specific vitrification protocols had been carried out. In these species the optimal cooling device was the Cryotop, with a dilution ratio of 1:1, using the mixture of MeOH and PG (1:1) in a final concentration of 30-40%. In case of rainbow trout, other authors have published vitrification protocols (Andreev et al., 2009; Figueroa et al., 2013; Merino et al., 2011), however, all of them have described very low (below 10%) cryoprotectant concentrations. With the use of these low cryoprotectant concentrations, the formation of ice crystals is not inhibited based on my own

observations, which leads to the loss of motility of the cells. In the studies listed above probably not actual vitrification occurred, only fast freezing - this idea is also supported by the relatively large cooling volume they have used.

In the Cyprinidae family (common carp, tench, zebrafish) the optimal protocols were considerably different regarding the optimal cryomedia and dilution ratio. The reason of this can be the diversity of carp species. With 0.4M trehalose supplementation in the cryomedia, the progressive motility following vitrification was significantly higher compared to the trehalose-free results in case of carp and tench. However, in case of zebrafish the same positive effect of trehalose was not observed.

In case of perch, fertilization test with vitrified sperm resulted in hatching larvae, thus we can conclude that vitrification can be used as an alternative method for the storage of perch sperm.

In case of European eel the positive effect of the osmoprotectant trehalose was proved. Beside this, the sperm head morphometric parameters were investigated, and methods were selected which do not lead to changes in these parameters.

Vitrification experiments in the absence of intracellular cryoprotectants have not resulted with motile spermatozoa in any species. Previous studies reported successful cryoprotectant-free vitrification in rainbow trout (Merino et al., 2012, 2011), however, with the protocol described by the authors, we were not able to obtain similar results.

With trehalose supplementation in the cryomedia, from the investigated 5 species we were able to enhance the post-thawing motility results in case of 3 species (carp, tench, eel). The potential osmoprotectant role of trehalose was not observed in case of zebrafish and grayling. Thus we can conclude that the reaction of the sperm cells to the trehalose has high species-specificity. The reason of this phenomenon could be the different tolerance of the species for the changing of the osmotic parameters of the environment.

Vitrification of testicular tissue was suitable for gene preservation of zebrafish and common carp. Viability of spermatogonia was proved by viability staining following thawing.

Successful *in vitro* gene preservation methods had been carried out in fish species: sperm vitrification methods in 8 species, and beside this, testicular tissue vitrification methods in 2 species.

9. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- Abed-Elmdoust, A., Farahmand, H., Mojazi-Amiri, B., Rafiee, G., Rahimi, R., 2015. Novel droplet vitrification combined with fish antifreeze protein type III enhances cryoprotection of semen in wild endangered Persian sturgeon *Acipenser persicus* (Borodin, 1897). *Aquac. Res.* 46, 2392–2397. doi:10.1111/are.12397
- Aksan, A., Toner, M., 2004. Isothermal desiccation and vitrification kinetics of trehalose-dextran solutions. *Langmuir* 20, 5521–5529. doi:10.1021/la0355186
- Alavi, S. M., H., Cosson, J.J., Coward, K., Raffie, G., 2008. *Fish Spermatology*. Alpha Science International Ltd.
- Ali, J., Shelton, J., 2007. Development of vitrification solutions. *Vitr. Assist. Reprod.* 45–63.
- Amann, R.P., Waberski, D., 2014. Computer-assisted sperm analysis (CASA): Capabilities and potential developments. *Theriogenology*. doi:10.1016/j.theriogenology.2013.09.004
- Anderson, W.A., Personne, P., 1970. The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. *J. Cell Biol.* 44, 29–51. doi:10.1083/jcb.44.1.29
- Andreev, a a, Gakhova, E.N., Pashovkin, T.N., 2009. Congelation of cryoprotective solutions and cryopreservation of fish sperm. *Biofizika* 54, 869–875. doi:10.1134/S0006350909050108
- Asturiano, J.F., Marco-Jiménez, F., Peñaranda, D.S., Garzón, D.L., Pérez, L., Vicente, J.S., Jover, M., 2007. Effect of sperm cryopreservation on the European eel sperm viability and spermatozoa morphology. *Reprod. Domest. Anim.* 42, 162–166. doi:10.1111/j.1439-0531.2006.00746.x
- Asturiano, J.F., Marco-Jiménez, F., Pérez, L., Balasch, S., Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Vicente, J.S., Viudes-de-Castro, M.P., Jover, M., 2006. Effects of hCG as spermiation inducer on European eel semen quality. *Theriogenology* 66, 1012–1020.

doi:10.1016/j.theriogenology.2006.02.041

- Babiak, I., Glogowski, J., Luczynski, M.J., Luczynski, M., 1997. Effect of individual male variability on cryopreservation of northern pike, *Esox lucius* L., sperm. *Aquac. Res.* 28, 191–197. doi:10.1046/j.1365-2109.1997.t01-1-00848.x
- Bakhtari, A., Rahmani, H.R., Bonakdar, E., Jafarpour, F., Asgari, V., Hosseini, S.M., Hajian, M., Edriss, M.A., Nasr-Esfahani, M.H., 2014. The interfering effects of superovulation and vitrification upon some important epigenetic biomarkers in mouse blastocyst. *Cryobiology* 69, 419–427. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.09.379
- Bakkers, J., 2011. Zebrafish as a model to study cardiac development and human cardiac disease. *Cardiovasc. Res.* doi:10.1093/cvr/cvr098
- Balaban, B., Urman, B., Ata, B., Isiklar, a., Larman, M.G., Hamilton, R., Gardner, D.K., 2008. A randomized controlled study of human Day 3 embryo cryopreservation by slow freezing or vitrification: Vitrification is associated with higher survival, metabolism and blastocyst formation. *Hum. Reprod.* 23, 1976–1982. doi:10.1093/humrep/den222
- Bart, A., 2000. New Approaches in Cryopreservation of Fish Embryos, in: *Cryopreservation in Aquatic Species*. pp. 179–187.
- Barton, M., 2007. *Bond's Biology of Fishes*, 3rd edition. ed. Thomson Brooks Cole, Belmont, California, 891 p.
- Bellastella, G., Cooper, T.G., Battaglia, M., Ströse, A., Torres, I., Hellenkemper, B., Soler, C., Sinisi, A.A., 2010. Dimensions of human ejaculated spermatozoa in Papanicolaou-stained seminal and swim-up smears obtained from the Integrated Semen Analysis System (ISAS®). *Asian J. Androl.* 12, 871–879. doi:10.1038/aja.2010.90
- Berlinguer, F., Succu, S., Mossa, F., Madeddu, M., Bebbere, D., Leoni, G.G., Naitana, S., 2007. Effects of trehalose co-incubation on in vitro matured prepubertal ovine oocyte vitrification.

- Cryobiology 55, 27–34. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.04.004
- Berrebi, P., Povz, M., Jesensek, D., Cattaneo-Berrebi, G., Crivelli, A.J., 2000. The genetic diversity of native, stocked and hybrid populations of marble trout in the Soca river, Slovenia. *Heredity (Edinb)*. 85, 277–287. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00753.x
- Billard, R., 1977. Utilisation d'un système tris-glycocolle pour tamponner le dilueur d'insémination pour truite. *Bull. Fr. Piscic. Volume 264*, 102–112.
- Blaxter, J.H.S., 1955. Herring Rearing - I: The Storage of Herring Gametes. *Mar. Res.* 3, 1–12.
- Blaxter, J.H.S., 1953. Sperm storage and cross fertilization of spring and autumn spawning herring. *Nature* 172, 1189–1190.
- Browne, R.K., Kaurova, S.A., Uteshev, V.K., Shishova, N. V., McGinnity, D., Figiel, C.R., Mansour, N., Agnew, D., Wu, M., Gakhova, E.N., Dzyuba, B., Cosson, J., 2015. Sperm motility of externally fertilizing fish and amphibians. *Theriogenology*. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.09.018
- Cabrita, E., Robles, V., Cuñado, S., Wallace, J.C., Sarasquete, C., Herráez, M.P., 2005. Evaluation of gilthead sea bream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology* 50, 273–284. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.02.005
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martínez-Páramo, S., Robles, V., Beirão, J., Pérez-Cerezales, S., Herráez, M.P., 2010. Cryopreservation of fish sperm: Applications and perspectives. *J. Appl. Ichthyol*. doi:10.1111/j.1439-0426.2010.01556.x
- Calvi, S., Maise, G., 1998. Cryopreservation of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Blastomeres: Influence of Embryo Stage on Postthaw Survival Rate. *Cryobiology* 36, 255–62. doi:10.1006/cryo.1998.2084
- Chao, N.H., Liao, I.C., 2001. Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*. 197, 161-189. doi:10.1016/S0044-8486(01)00586-5

- Chen, H., Zhang, L., Deng, T., Zou, P., Wang, Y., Quan, F., Zhang, Y., 2015. Effects of oocyte vitrification on epigenetic status in early bovine embryos. *Theriogenology*. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.03.008
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., 1994. Relationship between biochemical constituents of fish semen and fertility: the effect of short-term storage. *Fish Physiol. Biochem.* 12, 357–367. doi:10.1007/BF00004300
- Cosson, J., 2004. The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. *Aquac. Int.* 12, 69–85. doi:10.1023/B:AQUI.0000017189.44263.bc
- Crivelli, A., Poizat, G., Berrebi, P., Jesensek, D., Rubin, J.-F., 2000. Conservation biology applied to fish: the example of a project for rehabilitating the Marble Trout (*Salmo marmoratus*) in Slovenia. *Cybium*, 24/3, 211-230.
- Crowe, L.M., Reid, D.S., Crowe, J.H., 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys. J.* 71, 2087–93. doi:10.1016/S0006-3495(96)79407-9
- Cuevas-Uribe, R., Chesney, E.J., Daly, J., Tiersch, T.R., 2013. Vitrification of sperm from marine fish: Effect on motility and membrane integrity. *Aquac. Res.* 1–15. doi:10.1111/are.12337
- Cuevas-Uribe, R., Leibo, S.P., Daly, J., Tiersch, T.R., 2011a. Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. *Cryobiology* 63, 186–197. doi:10.1016/j.cryobiol.2011.06.004
- Cuevas-Uribe, R., Yang, H., Daly, J., Savage, M.G., Walter, R.B., Tiersch, T.R., 2011b. Production of F₁ offspring with vitrified sperm from a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus hellerii*. *Zebrafish* 8, 167–79. doi:10.1089/zeb.2011.0704
- Dai, Y.-J., Jia, Y.-F., Chen, N., Bian, W.-P., Li, Q.-K., Ma, Y.-B., Chen, Y.-L., Pei, D.-S., 2014. Zebrafish as a model system to study toxicology. *Environ. Toxicol. Chem.* 33, 11–7. doi:10.1002/etc.2406

- De Groot, S.J., 1987. Textbook of fish culture — Breeding and cultivation of fish. *Aquaculture* 65, 91. doi:10.1016/0044-8486(87)90274-2
- de Kretser, D.M., Loveland, K.L., Meinhardt, A., Simorangkir, D., Wreford, N., 1998. Spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 13 Suppl 1, 1–8.
- Desai, N.N., Blackmon, H., Goldfarb, J., 2004. Single sperm cryopreservation on cryoloops: an alternative to hamster zona for freezing individual spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online* 9, 47–53. doi:10.1016/S1472-6483(10)62109-8
- Dinnyes, A., Liu, J., Nedambale, T.L., 2007. Novel gamete storage. *Reprod. Fertil. Dev.* doi:10.1071/RD07035
- Drokin, S., Stein, H., 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, 263–270. doi: 10.1006/cryo.1998.2123
- Egerszegi, I., Somfai, T., Nakai, M., Tanihara, F., Noguchi, J., Kaneko, H., Nagai, T., Rátky, J., Kikuchi, K., 2013. Comparison of cytoskeletal integrity, fertilization and developmental competence of oocytes vitrified before or after in vitro maturation in a porcine model. *Cryobiology* 67, 287–292. doi:10.1016/j.cryobiol.2013.08.009
- Ellett, F., Lieschke, G.J., 2010. Zebrafish as a model for vertebrate hematopoiesis. *Curr. Opin. Pharmacol.* doi:10.1016/j.coph.2010.05.004
- Endo, Y., Fujii, Y., Shintani, K., Seo, M., Motoyama, H., Funahashi, H., 2012. Simple vitrification for small numbers of human spermatozoa. *Reprod. Biomed. Online* 24, 301–307. doi:10.1016/j.rbmo.2011.11.016
- Fahy, G.M., 1986. The relevance of cryoprotectant “toxicity” to cryobiology. *Cryobiology* 23, 1–13. doi:10.1016/0011-2240(86)90013-1
- Fahy, G.M., Levy, D.I., Ali, S.E., 1987. Some emerging principles underlying the physical

properties, biological actions, and utility of vitrification solutions. *Cryobiology* 24, 196–213.
doi:10.1016/0011-2240(87)90023-X

Fahy, G.M., MacFarlane, D.R., Angell, C.A., Meryman, H.T., 1984. Vitrification as an approach to cryopreservation. *Cryobiology* 21, 407–426.

Fahy, G.M., Rall, W.F., 2007. Vitrification: an overview, in: Tucker, M.J., Liebermann, J. (Eds.), *Vitrification in Assisted Reproduction*. Informa Healthcare, pp. 1–20.

Fahy, G.M., Wowk, B., Wu, J., Paynter, S., 2004. Improved vitrification solutions based on the predictability of vitrification solution toxicity. *Cryobiology* 48, 22–35.
doi:10.1016/j.cryobiol.2003.11.004

FAO, 2012a. *the State of World Fisheries and Aquaculture 2012, Aquaculture*. 230 p.

FAO, 2012b. *Phenotypic characterization of animal genetic resources, FAO Animal Production and Health Guidelines*. 158 p.

Fauvel, C., Suquet, M., Cosson, J., 2010. Evaluation of fish sperm quality. *J. Appl. Ichthyol.* 26, 636–643. doi:10.1111/j.1439-0426.2010.01529.x

Figuerola, E., Merino, O., Risopatrón, J., Isachenko, V., Sánchez, R., Effer, B., Isachenko, E., Farias, J.G., Valdebenito, I., 2015. Effect of seminal plasma on Atlantic salmon (*Salmo salar*) sperm vitrification. *Theriogenology* 83, 238–245.e2.
doi:10.1016/j.theriogenology.2014.09.015

Figuerola, E., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Merino, O., Isachenko, V., Valdebenito, I., 2013. Spermatozoa vitrification of sex-reversed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Effect of seminal plasma on physiological parameters. *Aquaculture* 372-375, 119–126.
doi:10.1016/j.aquaculture.2012.10.019

Franks, F., 1982. *Water and Aqueous Solutions at Subzero Temperatures*. Springer US, Boston, MA., 621 p. doi:10.1007/978-1-4757-6952-4

- Fribourgh, J.H., 1966. The Application of a Differential Staining Method to Low-Temperature Studies on Goldfish Spermatozoa. *Progress. Fish-Culturist* 28, 227–231.
- Fuller, B.J., 2004. Cryoprotectants: The essential antifreezes to protect life in the frozen state. *Cryo-Letters*. 25/6, 375-388.
- Garner, D.L., Johnson, L. a, Yue, S.T., Roth, B.L., Haugland, R.P., 1994. Dual DNA staining assessment of bovine sperm viability using SYBR-14 and propidium iodide. *J. Androl.* 15, 620–629. doi:SYBR-14, propidium iodide, vital dyes, sperm, staining
- Gravance, C.G., Champion, Z.J., Casey, P.J., 1998. Computer-assisted sperm head morphometry analysis (ASMA) of cryopreserved ram spermatozoa. *Theriogenology* 49, 1219–1230. doi:10.1016/S0093-691X(98)00069-7
- Gravance, C.G., Davis, R.O., 1995. Automated sperm morphometry analysis (ASMA) in the rabbit. *J Androl* 16, 88–93.
- Gravance, C.G., Vishwanath, R., Pitt, C., Casey, P.J., 1996. Computer automated morphometric analysis of bull sperm heads. *Theriogenology* 46, 1205–1215. doi:10.1016/S0093-691X(96)00291-9
- Gilmore, J. a, Liu, J., Gao, D.Y., Critser, J.K., 1997. Determination of optimal cryoprotectants and procedures for their addition and removal from human spermatozoa. *Hum. Reprod.* 12, 112–118.
- Graham, J.K., 1994. Effect of seminal plasma on the motility of epididymal and ejaculated spermatozoa of the ram and bull during the cryopreservation process. *Theriogenology* 41, 1151–1162. doi:10.1016/S0093-691X(05)80037-8
- Graham, J.K., Mocé, E., 2005. Fertility evaluation of frozen/thawed semen, in: *Theriogenology*. pp. 492–504. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.006
- Green, J.L., Angell, C. a., 1989. Phase Relations and Vitrification in Saccharide-Water Solutions

and the Trehalose Anomaly. *J Phys Chem* 93, 2880–2882. doi:10.1021/j100345a006

Gwo, J.-C., Jamieson, B.G.M., Leung, L.K.-P., 2009. Live preservation of fish gametes. *Reprod. Biol. Phylogeny Fishes (Agnathans Bony Fishes)* 395–484. doi:doi:10.1201/b10257-12

Hagedorn, M., Hsu, E., Kleinhans, F.W., Wildt, D.E., 1997. New approaches for studying the permeability of fish embryos: toward successful cryopreservation. *Cryobiology* 34, 335–347. doi:S0011-2240(97)92014-9 [pii]r10.1006/cryo.1997.2014

Hagedorn, M., Lance, S.L., Fonseca, D.M., Kleinhans, F.W., Artimov, D., Fleischer, R., Hoque, A.T., Hamilton, M.B., Pukazhenthil, B.S., 2002. Altering fish embryos with aquaporin-3: an essential step toward successful cryopreservation. *Biol Reprod* 67, 961–966. doi:10.1095/biolreprod.101.002915

Hidalgo, M., Dorado, J., 2009. Objective assessment of goat sperm head size by computer-assisted sperm morphometry analysis (ASMA). *Small Rumin. Res.* 87, 108–110. doi:10.1016/j.smallrumres.2009.10.006

Higaki, S., Eto, Y., Kawakami, Y., Yamaha, E., Kagawa, N., Kuwayama, M., Nagano, M., Katagiri, S., Takahashi, Y., 2010. Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. *Reproduction* 139, 733–740. doi:10.1530/REP-09-0549

Higaki, S., Kawakami, Y., Eto, Y., Yamaha, E., Nagano, M., Katagiri, S., Takada, T., Takahashi, Y., 2013a. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. *Cryobiology* 67, 374–382. doi:10.1016/j.cryobiol.2013.10.006

Higaki, S., Kawakami, Y., Eto, Y., Yamaha, E., Nagano, M., Katagiri, S., Takada, T., Takahashi, Y., 2013b. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. *Cryobiology* 67, 374–382. doi:10.1016/j.cryobiol.2013.10.006

- Higaki, S., Mochizuki, K., Baba, H., Akashi, Y., Yamaha, E., Katagiri, S., Takahashi, Y., 2009. Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. *Jpn. J. Vet. Res.* 57, 119–128.
- Hill, A.J., Teraoka, H., Heideman, W., Peterson, R.E., 2005. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity. *Toxicol. Sci.* doi:10.1093/toxsci/kfi110
- Horváth, Á., Bokor, Z., Bernáth, G., Csenki, Z., Gorjan, A., Herráez, M.P., Urbányi, B., Jesensek, D., 2015. Very low sperm-egg ratios result in successful fertilization using cryopreserved sperm in the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture* 435, 75–77. doi:10.1016/j.aquaculture.2014.09.032
- Horváth, Á., Bubalo, A., Cucevic, A., Bartulovic, V., Kotrik, L., Glamuzina, B., Urbányi, B., 2012. Cryopreservation of sperm and larvae of the European flat oyster (*Ostrea edulis*). *J. Appl. Ichthyol.* 28, 948–951.
- Horváth, Á., Jesensek, D., Csorbai, B., Bokor, Z., Raboczki, É., Kaczkó, D., Bernáth, G., Hoitsy, G., Urbányi, B., Bajec, S.S., Snoj, A., 2012. Application of sperm cryopreservation to hatchery practice and species conservation: A case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus*). *Aquaculture* 358-359, 213–215. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.012
- Horváth, A., John, V., Szenci, O., 2006a. A hímivarsejtek mozgása, irodalmi összefoglaló, 2. rész. A mozgást vizsgáló módszerek fejlődése. *Magy. Állatorvosok Lapja* 7, 437–442.
- Horváth, A., John, V., Szenci, O., 2006b. A spermiumok motilitása I. (A motilitás strukturális háttere és vizsgálata). *Magy. Állatorvosok Lapja* 5., 308–316.
- Horváth, L., 2000. Halbiológia és haltenyésztés, Halbiológia és haltenyésztés. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I.I., Dessole, S., Nawroth, F., 2003. Vitrification of mammalian spermatozoa in the absence of cryoprotectants: from past practical difficulties to

present success. *Reprod. Biomed. Online* 6, 191–200. doi:10.1016/S1472-6483(10)61710-5

Isachenko, E., Isachenko, V., Katkov, I.I., Rahimi, G., Schöndorf, T., Mallmann, P., Dessolet, S., Nawroth, F., 2004. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum. Reprod.* 19, 932–939. doi:10.1093/humrep/deh194

Isachenko, V., Isachenko, E., Katkov, I.I., Montag, M., Dessolet, S., Nawroth, F., Van Der Ven, H., 2004. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol. Reprod.* 71, 1167–73. doi:10.1095/biolreprod.104.028811

Isayeva, A., Zhang, T., Rawson, D.M., 2004. Studies on chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) oocytes. *Cryobiology* 49, 114–122. doi:10.1016/j.cryobiol.2004.05.005

Jamieson, B.G.M., 1991. *Fish Evolution and Systematics: evidence from spermatozoa*. Cambridge University Press.

Jin, B., Kleinhans, F.W., Mazur, P., 2014. Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. *Cryobiology* 68, 419–430. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.03.005

Jing, R., Huang, C., Bai, C., Tanguay, R., Dong, Q., 2009. Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. *Aquaculture* 290, 165–171. doi:10.1016/j.aquaculture.2009.02.027

Jonathan, S., Niall, B., 1992. *Intensive Fish Farming*. Blackwell Scientific Publications.

Judycka, S., Cejko, B.I., Dryl, K., Dobosz, S., Grudniewska, J., Kowalski, R.K., 2016. The effect of supplementation of a trehalose-based extender with KCl on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm freezability and post-thaw motility. *Aquaculture* 465, 303–310. doi:10.1016/j.aquaculture.2016.09.029

- Kása, E., Bernáth, G., Kollár, T., Zarski, D., Lujic, J., Marinovic, Z., Bokor, Z., Hegyi, Á., Urbányi, B., Vílchez, M.C., Morini, M., Penaranda, D.S., Pérez, L., Asturiano, J.F., Horváth, Á., 2016. Development of sperm vitrification protocols for freshwater fish (Eurasian perch, *Perca fluviatilis*) and marine fish (European eel, *Anguilla anguilla*). *Gen. Comp. Endocrinol.* doi:doi:10.1016/j.ygcen.2016.05.010
- Kawakami, Y., Saito, T., Fujimoto, T., Goto-Kazeto, R., Takahashi, E., Adachi, S., Arai, K., Yamaha, E., 2012. Technical note: Viability and motility of vitrified/thawed primordial germ cell isolated from common carp (*Cyprinus carpio*) somite embryos. *J. Anim. Sci.* 90, 495–500. doi:10.2527/jas.2011-4329
- Kime, D.E., Ebrahimi, M., Nysten, K., Roelants, I., Rurangwa, E., Moore, H.D.M., Ollevier, F., 1996. Use of computer assisted sperm analysis (CASA) for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquat. Toxicol.* 36, 223–237. doi:10.1016/S0166-445X(96)00806-5
- Kime, D.E., Van Look, K.J.W., McAllister, B.G., Huyskens, G., Rurangwa, E., Ollevier, F., 2001. Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish, in: *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. pp. 425–433. doi:10.1016/S1532-0456(01)00270-8
- Kiss, I., 2000. A halak testfelépítése és biológiája., in: Horváth, L. (Ed.), *Halbiológia És Haltenyésztés*. Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 440.
- Koh, I.C.C., Yokoi, K.I., Tsuji, M., Tsuchihashi, Y., Ohta, H., 2010. Cryopreservation of sperm from seven-band grouper, *Epinephelus septemfasciatus*. *Cryobiology* 61, 263–267. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.09.003
- Kopeika, E., Kopeika, J., Zhang, T., 2007. Cryopreservation of fish sperm. *Methods Mol. Biol.* 368, 203–17. doi:10.1007/978-1-59745-362-2_14
- Krasznai, Z., Marian, T., Izumi, H., Damjanovich, S., Balkay, L., Tron, L., Morisawa, M., 2000.

Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca²⁺ channels, leading to Ca²⁺ influx and subsequent initiation of sperm motility in the common carp. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 2052–2057. doi:10.1073/pnas.040558097

Kuleshova, L.L., Gouk, S.S., Hutmacher, D.W., 2007. Vitrification as a prospect for cryopreservation of tissue-engineered constructs. *Biomaterials* 28, 1585–1596. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.11.047

Kuwayama, M., 2007. Highly efficient vitrification for cryopreservation of human oocytes and embryos: The Cryotop method. *Theriogenology* 67, 73–80. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.014

Labbé, C., Robles, V., Herraéz, M.P., 2013. Cryopreservation of gametes for aquaculture and alternative cell sources for genome preservation, *Advances in aquaculture hatchery technology*. 76-116. doi:10.1533/9780857097460.1.76

Lacerda, S.M.S.N., Costa, G.M.J., Campos-Junior, P.H.A., Segatelli, T.M., Yazawa, R., Takeuchi, Y., Morita, T., Yoshizaki, G., França, L.R., 2013. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiol. Biochem.* 39, 3–11. doi:10.1007/s10695-012-9606-4

Lahnsteiner, F., 2011. Spermatozoa of the teleost fish *Perca fluviatilis* (perch) have the ability to swim more than two hours in saline solutions. *Aquaculture* 314, 221–224.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., Patzner, R.A., 1998. Determination of semen quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture* 163, 163–181. doi:10.1016/S0044-8486(98)00243-9

Lee, S., Seki, S., Katayama, N., Yoshizaki, G., 2015. Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. *Sci. Rep.* 5, 16045. doi:10.1038/srep16045

- Lee, Y.S., Lee, S., Lee, S.H., Yang, B.K., Park, C.K., 2015. Effect of cholesterol-loaded-cyclodextrin on sperm viability and acrosome reaction in boar semen cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 159, 124–130. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.06.006
- Leibovitz, A., 1963. The growth and maintenance of tissue/cell cultures in free gas exchange with the atmosphere. *Amer. J. Hyg.* 78, 173–180.
- Lele, Z., Krone, P.H., 1996. The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnol. Adv.* 14, 57–72. doi:10.1016/0734-9750(96)00004-3
- Lieschke, G.J., Currie, P.D., 2007. Animal models of human disease: zebrafish swim into view. *Nat. Rev. Genet.* 8, 353–367. doi:10.1038/nrg2091
- Liu, X., Zhang, T., Rawson, D., 1999. The effect of partial removal of yolk on the chilling sensitivity of zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Cryobiology* 39, 236–42. doi:10.1006/cryo.1999.2206
- Liu, X.H., Zhang, T., Rawson, D.M., 2001. Effect of cooling rate and partial removal of yolk on the chilling injury in zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology* 55, 1719–1731. doi:10.1016/S0093-691X(01)00515-5
- Liu, J., Cheng, K.M., Silversides, F.G., 2012. Novel needle-in-straw vitrification can effectively preserve the follicle morphology, viability, and vascularization of ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Anim. Reprod. Sci.* 134, 197–202. doi:10.1016/j.anireprosci.2012.08.002
- Liu, Q., Wang, X., Wang, W., Zhang, X., Xu, S., Ma, D., Xiao, Z., Xiao, Y., Li, J., 2015. Effect of the addition of six antioxidants on sperm motility, membrane integrity and mitochondrial function in red seabream (*Pagrus major*) sperm cryopreservation. *Fish Physiol. Biochem.* 41, 413–422. doi:10.1007/s10695-014-9993-9
- Liu, X.H., Zhang, T., Rawson, D.M., 1998. Feasibility of vitrification of zebrafish (*Danio rerio*) embryos using methanol. *Cryo-Letters* 19, 309–318.

- Lu, J.C., Huang, Y.F., Lü, N.Q., 2014. Computer-aided sperm analysis: Past, present and future. *Andrologia* 46, 329–338. doi:10.1111/and.12093
- Lubzens, E., Young, G., Bobe, J., Cerdá, J., 2010. Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 367–389. doi:10.1016/j.ygcen.2009.05.022
- Luyet, B.J., Hodapp, E.L., 1938. Revival of frog's spermatozoa vitrified in liquid air., in: *Proceeding Of the Society for Experimental Biology and Medicine* 39. pp. 433–434.
- MacRae, C.A., Peterson, R.T., 2015. Zebrafish as tools for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 14, 721–731. doi:10.1038/nrd4627
- Magyary, I., Dinnyes, a., Varkonyi, E., Szabo, R., Varadi, L., 1995. Cryopreservation of fish embryos and embryonic cells. *Aquaculture* 137, 108. doi:10.1016/0044-8486(96)83543-5
- Maisse, G., Labbe, C., Baulny, B.O., Calvi, S.L., Haffray, P., 1998. Cryopreservation of fish semen and embryos. [French]. *Prod. Anim.* 11, 57-65.
- Makler, A., 1978. A new chamber for rapid sperm count and motility estimation. *Fertil. Steril.* 30, 313–8.
- Malhotra, D., Sebat, J., 2012. Genetics: Fish heads and human disease. *Nature* 485, 318–319. doi:10.1038/485318a
- Marco-Jiménez, F., Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Pérez, L., Viudes-de-Castro, M.P., Vicente, J.S., Jover, M., Asturiano, J.F., 2006a. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) spermatozoa: Effect of dilution ratio, foetal bovine serum supplementation, and cryoprotectants. *Cryobiology* 53, 51–57. doi:10.1016/j.cryobiol.2006.03.011
- Marco-Jiménez, F., Pérez, L., Castro, M.P.V. De, Garzón, D.L., Peñaranda, D.S., Vicente, J.S., Jover, M., Asturiano, J.F., 2006b. Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology* 65, 1302–1310. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.08.008

- Marinović, Z., Lujčić, J., Kása, E., Bernáth, G., Urbányi, B., Horváth, Á. 2017. Cryosurvival of isolated testicular cells and testicular tissue of tench *Tinca tinca* and goldfish *Carassius auratus* following slow-rate freezing. *General and Comparative Endocrinology, Fish Gametes Special Issue*. 245, 77-83. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.07.005>
- Martínez-Páramo, S., Horváth, Á., Labbé, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Suquet, M., Adams, S., Viveiros, A., Tiersch, T.R., Cabrita, E., 2017. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquaculture.2016.05.042>
- Martínez-Pastor, F., Mata-Campuzano, M., Álvarez-Rodríguez, M., Álvarez, M., Anel, L., de Paz, P., 2010. Probes and techniques for sperm evaluation by flow cytometry. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 67–78. doi:[10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2010.01622.x)
- Mattei, X., 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. *Can. J. Zool.* 69, 3038–3055. doi:[10.1139/z91-428](https://doi.org/10.1139/z91-428)
- Mazur, P., 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *Am. J. Physiol.* 247, C125–C142. doi:review
- Mazur, P., Leibo, S.P., Chu, E.H.Y., 1972. A two-factor hypothesis of freezing injury. Evidence from Chinese hamster tissue-culture cells. *Exp. Cell Res.* 71, 345–355. doi:[10.1016/0014-4827\(72\)90303-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90303-5)
- Mazur, P., Leibo, S.P., Seidel, G.E., 2008. Cryopreservation of the germplasm of animals used in biological and medical research: importance, impact, status, and future directions. *Biol. Reprod.* 78, 2–12. doi:[10.1095/biolreprod.107.064113](https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.064113)
- Mazur, P., Paredes, E., 2016. Roles of intracellular ice formation, vitrification of cell water, and recrystallisation of intracellular ice on the survival of mouse embryos and oocytes, in: *Reproduction, Fertility and Development*. pp. 1088–1091. doi:[10.1071/RD16021](https://doi.org/10.1071/RD16021)
- Merino, O., Risopatrón, J., Sánchez, R., Isachenko, E., Figueroa, E., Valdebenito, I., Isachenko,

V., 2011. Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitrification: Stability of mitochondrion as criterion of effectiveness. *Anim. Reprod. Sci.* 124, 125–131. doi:10.1016/j.anireprosci.2011.02.023

Merino, O., Sánchez, R., Risopatrón, J., Isachenko, E., Katkov, I.I., Figueroa, E., Valdebenito, I., Mallmann, P., Isachenko, V., 2012. Cryoprotectant-free vitrification of fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa: First report. *Andrologia* 44, 390–395. doi:10.1111/j.1439-0272.2011.01196.x

Mocé, E., Blanch, E., Tomás, C., Graham, J.K., 2010. Use of cholesterol in sperm cryopreservation: Present moment and perspectives to future. *Reprod. Domest. Anim.* 45, 57–66. doi:10.1111/j.1439-0531.2010.01635.x

Mocé, E., Graham, J.K., 2006. Cholesterol-loaded cyclodextrins added to fresh bull ejaculates improve sperm cryosurvival. *J. Anim. Sci.* 84, 826–833.

Mocé, E., Purdy, P.H., Graham, J.K., 2010. Treating ram sperm with cholesterol-loaded cyclodextrins improves cryosurvival. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 236–247. doi:10.1016/j.anireprosci.2009.06.013

Mocé, E., Tomás, C., Blanch, E., Graham, J.K., 2014. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrins on bull and goat sperm processed with fast or slow cryopreservation protocols. *Animal* 8, 771–6. doi:10.1017/S1751731114000226

Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005. Effect of seminal plasma on the cryopreservation of equine spermatozoa. *Theriogenology* 63, 2372–2381. doi:10.1016/j.theriogenology.2004.05.032

Moore, A.I., Squires, E.L., Graham, J.K., 2005. Adding cholesterol to the stallion sperm plasma membrane improves cryosurvival. *Cryobiology* 51, 241–249. doi:10.1016/j.cryobiol.2005.07.004

- Morisawa, M., Suzuki, K., 1980. Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science* 210, 1145–7. doi:10.1126/science.7444445
- Müller, K., Müller, P., Pincemy, G., Kurz, A., Labbe, C., 2008. Characterization of sperm plasma membrane properties after cholesterol modification: consequences for cryopreservation of rainbow trout spermatozoa. *Biol. Reprod.* 78, 390–9. doi:10.1095/biolreprod.107.064253
- Müller, T., Horváth, Á., Takahashi, E., Kolics, B., Bakos, K., Decsi, K., Kovács, B., Taller, J., Urbányi, B., Bercsényi, M., Horváth, L., Adachi, S., Arai, K., Yamaha, E., 2012. Artificial hybridization of Japanese and European eel (*Anguilla japonica*, *A. anguilla*) by using cryopreserved sperm from freshwater reared males. *Aquaculture* 350-353, 130–133. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.04.007
- Nagy, S., Hallap, T., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H., 2004. Changes in plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed bovine spermatozoa during a 4 h incubation as measured by multicolor flow cytometry. *Anim. Reprod. Sci.* 80, 225–235. doi:10.1016/j.anireprosci.2003.08.003
- Nagy, S., Jansen, J., Topper, E.K., Gadella, B.M., 2003. A Triple-Stain Flow Cytometric Method to Assess Plasma-and Acrosome-Membrane Integrity of Cryopreserved Bovine Sperm Immediately after Thawing in Presence of Egg-Yolk Particles. *Biol. Reprod.* 68, 1828–1835. doi:10.1095/biolreprod.102.011445
- Nawroth, F., Isachenko, V., Dessole, S., Rahimi, G., Farina, M., Vargiu, N., Mallmann, P., Dattena, M., Capobianco, G., Peters, D., Orth, I., Isachenko, E., 2002. Vitrification of human spermatozoa without cryoprotectants. *Cryo-Letters* 23, 93–102.
- Nóbrega, R.H., Batlouni, S.R., França, L.R., 2009. An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol. Biochem.* doi:10.1007/s10695-008-9252-z
- Okazaki, T., Shimada, M., 2012. New strategies of boar sperm cryopreservation: Development of

novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Anim. Sci.*

J. doi:10.1111/j.1740-0929.2012.01034.x

Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2006. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish.

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103, 2725–2729. doi:10.1073/pnas.0509218103

Oliveira, C.H., Vasconcelos, A.B., Souza, F.A., Martins-Filho, O.A., Silva, M.X., Varago, F.C.,

Lagares, M.A., 2010. Cholesterol addition protects membrane intactness during cryopreservation of stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 118, 194–200.

doi:10.1016/j.anireprosci.2009.08.011

Paniagua-Chavez, C.G., Jenkins, J., Segovia, M., Tiersch, T.R., 2006. Assessment of gamete quality for the eastern oyster (*Crassostrea virginica*) by use of fluorescent dyes. *Cryobiology*

53, 128–138. doi: 10.1016/j.cryobiol.2006.05.001

Paxton, J.R., Eschmeyer, W.N., 2003. *Encyclopedia of fishes*, 2nd Editio. ed. Fog City Press, San Francisco, California.

Pegg, D.E., 2005. The role of vitrification techniques of cryopreservation in reproductive medicine. *Hum. Fertil.* 8, 231–239. doi:10.1080/14647270500054803

Peña, F.J., Saravia, F., García-Herreros, M., Núñez-martínez, I., Tapia, J.A., Johannisson, A., Wallgren, M., Rodríguez-Martínez, H., 2005. Identification of sperm morphometric

subpopulations in two different portions of the boar ejaculate and its relation to postthaw quality. *J. Androl.* 26, 716–723. doi:10.2164/jandrol.05030

Peñaranda D.S., Pérez, L., Marco-Jiménez, F., Jover, M., Asturiano, J.F., 2008. Advances in techniques for the control of European eel reproduction: Spermiation induction, sperm quality evaluation and cryopreservation. *Cybium* 32, 323.

Peñaranda, D.S., Pérez, L., Gallego, V., Jover, M., Asturiano, J.F., 2009. Improvement of

- European eel sperm cryopreservation method by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. *Cryobiology* 59, 119–126. doi:10.1016/j.cryobiol.2009.06.001
- Perez, L., Asturiano, J.F., 2000. Induction of maturation and spermiation in the male European eel: assessment of sperm quality throughout treatment. *J. Fish Biol.* 57, 1488–1504. doi:10.1006/jfbi.2000.1411
- Pintér, K., 2015. Magyarország halai, 4. ed. Mezőgazda Kiadó, Budapest.
- Polge, C., Smith, a U., Parkes, A.S., 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature* 164, 666. doi:10.1038/164666a0
- Pribenszky, C., Horváth, A., Végh, L., Huang, S.Y., Kuo, Y.H., Szenci, O., 2011. Stress preconditioning of boar spermatozoa: A new approach to enhance semen quality. *Reprod. Domest. Anim.* 46, 26–30. doi:10.1111/j.1439-0531.2011.01812.x
- Purdom, C.E., 1993. Genetics and fish breeding, Fish and fisheries series.
- Rall, W.F., 1987. Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology* 24, 387–402. doi:10.1016/0011-2240(87)90042-3
- Riesco, M.F., Robles, V., 2013. Cryopreservation Causes Genetic and Epigenetic Changes in Zebrafish Genital Ridges. *PLoS One* 8. doi:10.1371/journal.pone.0067614
- Robles, V., Cabrita, E., Acker, J., Herráez, P., 2009a. *Methods in Reproductive Aquaculture*. CRC Press, Boca Raton, Florida, p 265-294.
- Robles, V., Cabrita, E., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J., Herráez, M.P., 2005. Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. *Theriogenology* 64, 1633–1646. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.04.014
- Robles, V., Cabrita, E., Herráez, M.P., 2009b. Germplasm cryobanking in zebrafish and other aquarium model species. *Zebrafish* 6, 281–93. doi:10.1089/zeb.2009.0592

- Robles, V., Riesco, M.F., Psenicka, M., Saito, T., Valcarce, D.G., Cabrita, E., Herrarez, P., 2016. Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. *Aquaculture*. doi:DOI: 10.1016
- Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., Nash, J.P., 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. *Aquaculture*. doi:10.1016/j.aquaculture.2003.12.006
- Saenz-de-Juano, M.D., Penaranda, D.S., Marco-Jimenez, F., Vicente, J.S., 2014. Does vitrification alter the methylation pattern of OCT4 promoter in rabbit late blastocyst? *Cryobiology* 69, 178–180. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.06.002
- Schulz, R.W., de Franca, L.R., Lareyre, J.J., LeGac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., Miura, T., 2010. Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 390–411. doi:10.1016/j.ygcen.2009.02.013
- Schuster, T.G., Keller, L.M., Dunn, R.L., Ohl, D.A., Smith, G.D., 2003. Ultra-rapid freezing of very low numbers of sperm using cryoloops. *Hum. Reprod.* 18, 788–795. doi:10.1093/humrep/deg162
- Segovia, M., Jenkins, J.A., Paniagua-Chavez, C., Tiersch, T.R., 2000. Flow cytometric evaluation of antibiotic effects on viability and mitochondrial function of refrigerated spermatozoa of Nile tilapia. *Theriogenology* 53, 1489–1499. doi:10.1016/S0093-691X(00)00291-0
- Seki, S., Kusano, K., Lee, S., Iwasaki, Y., Yagisawa, M., Ishida, M., Hiratsuka, T., Sasado, T., Naruse, K., Yoshizaki, G., 2017. Production of the medaka derived from vitrified whole testes by germ cell transplantation. *Sci. Rep.* doi:doi: 10.1038/srep43185
- Seki, S., Mazur, P., 2011. Stability of mouse oocytes at -80C: The role of the recrystallization of intracellular ice. *Reproduction* 141, 407–415. doi:10.1530/REP-10-0438
- Seth, A., Stemple, D.L., Barroso, I., 2013. The emerging use of zebrafish to model metabolic

- disease. *Dis. Model. Mech.* 6, 1080–8. doi:10.1242/dmm.011346
- Shaw, J.M., Jones, G.M., 2003. Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos. *Hum. Reprod. Update.* doi:10.1093/humupd/dmg041
- Smith, G.D., Motta, E.E., Serafini, P., 2011. Theoretical and experimental basis of oocyte vitrification, in: *Reproductive BioMedicine Online.* pp. 298–306. doi:10.1016/j.rbmo.2011.05.003
- Somfai, T., Men, N.T., Noguchi, J., Kaneko, H., 2015. Optimization of cryoprotectant treatment for the vitrification of immature cumulus-enclosed porcine oocytes: comparison of sugars, combinations of permeating cryoprotectants and equilibration regimens. *J. Reprod. Dev.* 61, 571–579. doi:10.1262/jrd.2015-089
- Somfai, T., Noguchi, J., Kaneko, H., Nakai, M., Ozawa, M., Kashiwazaki, N., Egerszegi, I., Rátky, J., Nagai, T., Kikuchi, K., 2010. Production of good-quality porcine blastocysts by in vitro fertilization of follicular oocytes vitrified at the germinal vesicle stage. *Theriogenology* 73, 147–156. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.08.008
- Spitsbergen, J., Kent, M., 2003. The State of the Art of the Zebrafish Model for Toxicology and Toxicologic Pathology Research - Advantages and Current Limitations. *Toxicol. Pathol.* 31, 62–87. doi:10.1080/01926230390174959
- Spitsbergen, J.M., Kent, M.L., 2007. The state of the art of the zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research--advantages and current limitations. *Toxicol. Pathol.* 31 Suppl, 62–87. doi:10.1080/01926230309774
- Streit-Jr, D.P., Godoy, L.C. De, Ricardo Pereira, R., Darci Carlos, F., Melanie, D., Zhang, T., 2014. Cryopreservation of Embryos and Oocytes of South American Fish Species, in: *Recent Advances in Cryopreservation.* p. 130. doi:10.5772/56998

- Strober, W., 2001. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr. Protoc. Immunol.* Appendix 3, Appendix 3B. doi:10.1002/0471142735.ima03bs21
- Sullivan, C., Kim, C.H., 2008. Zebrafish as a model for infectious disease and immune function. *Fish Shellfish Immunol.* 25, 341–50. doi:10.1016/j.fsi.2008.05.005
- Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., Billard, R., 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquac. Res.* 31, 231–243. doi:10.1046/j.1365-2109.2000.00445.x
- Sušnik, S., Berrebi, P., Dovč, P., Hansen, M.M., Snoj, A., 2004. Genetic introgression between wild and stocked salmonids and the prospects for using molecular markers in population rehabilitation: the case of the Adriatic grayling (*Thymallus thymallus* L. 1785). *Heredity* (Edinb). 93, 273–282. doi:10.1038/sj.hdy.6800500
- Szabó, G., Müller, T., Bercsényi, M., Urbányi, B., Kucska, I.B., Horváth, A., 2005. Cryopreservation of European eel (*Anguilla anguilla*) sperm using different extenders and cryoprotectants. Short communication. *Acta Biol. Hung.* 56, 173–175. doi:10.1556/ABiol.56.2005.1-2.18
- Taylor, M., Song, Y.S., Brockbank, K.G.M., 2009. Vitrification in tissue preservation., in: Fuller, B.J., Lane, N., Benson, E.E. (Eds.), *Life in the Frozen State*. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 603–641.
- Tiersch, T.R., Yang, H., Hu, E., 2012. Outlook for development of high-throughput cryopreservation for small-bodied biomedical model fishes, in: *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. pp. 49–54. doi:10.1016/j.cbpc.2011.08.007
- Tsai, H.-H., Tsai, C.-H., Wu, W.-T., Chen, F.-Z., Chiang, P.-J., 2015. Numerical investigation into thermal effects of pre-cooling zone in vitrification-based cryopreservation process. *Cryobiology* 70, 32–37. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.11.003

- Tsai, S., Lin, C., 2012. Advantages and applications of cryopreservation in fisheries science. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 55, 425–434. doi:10.1590/S1516-89132012000300014
- Vajta, G., Nagy, Z.P., 2006. Are programmable freezers still needed in the embryo laboratory? Review on vitrification. *Reprod. Biomed. Online* 12, 779–796. doi:10.1016/S1472-6483(10)61091-7
- Vajta, G., Nagy, Z.P., Cobo, A., Conceicao, J., Yovich, J., 2009. Vitrification in assisted reproduction: Myths, mistakes, disbeliefs and confusion, in: *Reproductive BioMedicine Online*. pp. 1–7. doi:10.1016/S1472-6483(10)60278-7
- Van Landuyt, L., Stoop, D., Verheyen, G., Verpoest, W., Camus, M., Van De Velde, H., Devroey, P., Van Den Abbeel, E., 2011. Outcome of closed blastocyst vitrification in relation to blastocyst quality: Evaluation of 759 warming cycles in a single-embryo transfer policy. *Hum. Reprod.* 26, 527–534. doi:10.1093/humrep/deq374
- Van Look, K.J.W., Kime, D.E., 2003. Automated sperm morphology analysis in fishes: The effect of mercury on goldfish sperm. *J. Fish Biol.* 63, 1020–1033. doi:10.1046/j.1095-8649.2003.00226.x
- Varela Junior, A. S., Goularte, K.L., Alves, J.P., Pereira, F. a., Silva, E.F., Cardoso, T.F., Jardim, R.D., Streit Jr, D.P., Corcini, C.D., 2015. Methods of cryopreservation of Tambaqui semen, *Colossoma macropomum*. *Anim. Reprod. Sci.* 157, 71–77. doi:10.1016/j.anireprosci.2015.03.017
- Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S., Nimrat, S., 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology* 72, 129–138. doi:10.1016/j.theriogenology.2009.02.013
- Wang, Y., Xiao, Z., Li, L., Fan, W., Li, S.-W., 2008. Novel needle immersed vitrification: a practical and convenient method with potential advantages in mouse and human ovarian

tissue cryopreservation. *Hum. Reprod.* 23, 2256–65. doi:10.1093/humrep/den255

Weiss, A.D.H., Fraser Forbes, J., Scheurman, A., Law, G.K., Elliott, J.A.W., McGann, L.E., Jomha, N.M., 2010. Statistical prediction of the vitrifiability and glass stability of multi-component cryoprotective agent solutions. *Cryobiology* 61, 123–127. doi:10.1016/j.cryobiol.2010.05.008

WHO, 2010. Examination and processing of human semen. *J. Androl.*, 30, 1-286.

WHO, 2010. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization, Geneva, 271 p.

Wilson-Leedy, J.G., Ingermann, R.L., 2007. Development of a novel CASA system based on open source software for characterization of zebrafish sperm motility parameters. *Theriogenology* 67, 661–672. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.10.003

Woelders, H., Windig, J., Hiemstra, S.J., 2012. How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (Farm) animals. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 264–273. doi:10.1111/j.1439-0531.2012.02085.x

Woynarovich, A., Hoitsy, G., Moth-Poulsen, T., 2011. Small-scale rainbow trout farming, *FAO fisheries and aquaculture*, 81 p.

Wusteman, M.C., Simmonds, J., Vaughan, D., Pegg, D.E., 2008. Vitrification of rabbit tissues with propylene glycol and trehalose. *Cryobiology* 56, 62–71. doi:10.1016/j.cryobiol.2007.10.177

Xiao, Z., Wang, Y., Li, L., Luo, S., Li, S.W., 2010. Needle immersed vitrification can lower the concentration of cryoprotectant in human ovarian tissue cryopreservation. *Fertil. Steril.* 94, 2323–2328. doi:10.1016/j.fertnstert.2010.01.011

Yang, H., Tiersch, T.R., 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: Zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*. *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol.*

Pharmacol. doi:10.1016/j.cbpc.2008.07.005

Yániz, J.L., Soler, C., Santolaria, P., 2015. Computer assisted sperm morphometry in mammals:

A review. *Anim. Reprod. Sci.* doi:10.1016/j.anireprosci.2015.03.002

Yavin, S., Arav, A., 2007. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions.

Theriogenology 67, 81–89. doi:10.1016/j.theriogenology.2006.09.029

Yoshizaki, G., Fujinuma, K., Iwasaki, Y., Okutsu, T., Shikina, S., Yazawa, R., Takeuchi, Y., 2011.

Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources, in: *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*. pp. 55–63. doi:10.1016/j.cbd.2010.05.003

Yoshizaki, G., Ichikawa, M., Hayashi, M., Iwasaki, Y., Miwa, M., Shikina, S., Okutsu, T., 2010.

Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development* 137, 1227–30. doi:10.1242/dev.044982

Yoshizaki, G., Lee, S., 2016. Successful cryopreservation of spermatogonia in critically

endangered Manchurian trout (*Brachymystax lenok*). *Cryobiology* 72, 165–168.

Yoshizaki, G., Takeuchi, Y., Kobayashi, T., Takeuchi, T., 2003. Primordial germ cell: A novel

tool for fish bioengineering. *Fish Physiol. Biochem.* 28, 453–457. doi:10.1023/B:FISH.0000030628.91607.2d

Zarski, D., Krejszeff, S., Horváth, Á., Bokor, Z., Palinska, K., Szentes, K., Luczynska, J.,

Targonska, K., Kupren, K., Urbányi, B., Kucharczyk, D., 2012. Dynamics of composition and morphology in oocytes of Eurasian perch, *Perca fluviatilis* L., during induced spawning. *Aquaculture* 364–365, 103–110. doi:10.1016/j.aquaculture.2012.07.030

Zeng, C., Peng, W., Ding, L., He, L., Zhang, Y., Fang, D., Tang, K., 2014. A preliminary study on

epigenetic changes during boar spermatozoa cryopreservation. *Cryobiology* 69, 119–127. doi:10.1016/j.cryobiol.2014.06.003

Zhang, T., Rawson, D.M., 1998. Permeability of dechorionated one-cell and six-somite stage zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos to water and methanol. *Cryobiology* 37, 13–21. doi:10.1006/cryo.1998.2093

Zhang, T., Rawson, D.M., 1996. Feasibility Studies on Vitrification of Intact Zebrafish (*Brachydanio rerio*) Embryos. *Cryobiology* 33, 1–13. doi:10.1006/cryo.1996.0001

Zhang, X., Khimji, I., Shao, L., Safaee, H., Desai, K., Keles, H.O., Gurkan, U.A., Kayaalp, E., Nureddin, A., Anchan, R.M., Maas, R.L., Demirci, U., 2012. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation. *Nanomedicine* 7, 553–564. doi:10.2217/nnm.11.145

Internet1: <http://www.iucnredlist.org/> (utolsó megtekintés: 2017. 05. 23.)

Internet2: <http://www.casa-scopus.com> (utolsó megtekintés: 2017. 05. 23.)

Internet3: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=sperm+vitrification>
(utolsó megtekintés: 2017. 05. 23.)

Internet4: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=fish+sperm+vitrification>
(utolsó megtekintés: 2017. 05. 23.)

Internet5: <https://en.wikipedia.org/wiki/Trehalose> (utolsó megtekintés: 2017. 05. 23.)

M2. A vizsgálatok során használt oldatok összetétele

- **DIA523 (Lazacfélék termékenyítő oldata):** 94 mM NaCl, 50 mM glicin, 20 mM Tris (Billard, 1977)
- **HANK'S féle só oldat (HBSS):** 0,137 M NaCl, 5,4 mM KCl, 1,3 mM CaCl₂ × 2 H₂O, 1 mM MgSO₄ × 7 H₂O, 0,25 mM Na₂HPO₄, 0,44 mM KH₂PO₄, 4,2 mM NaHCO₃, 0,1 g C₆H₁₂O₆, pH 7,5 (Sigma-Aldrich, H9269)
- **Leibovitz-féle L-15 oldat (mg/L):** CaCl₂ 185.000, MgCl₂ 200.000, MgSO₄ 97.720, KCl 400.000, KH₂PO₄ 60.000, NaCl 8000.000 Na₂HPO₄ 190.120, DL-Alfa alanin 450.000, Glicin 200.000, L-Arginin 500.000, L-Asparagin 250.000, L-Cisztein 120.000, L-Glutamin 300.000, L-Hisztidin 250.000, L-Izoleucin 250.000, L-Leucin 125.000, L-Lizin hidroklorid 94.000, L-Metionin 75.000, L-Fenilalanin 125.000, L-Szerin 200.000, L-Treonin 300.000, L-Triptofán 20.000, L-Tirozin Dinátrium Só 276.160, L-Valin 100.000, Kolin klorid 1.000, D-Ca-Pantotenát 1.000, Folsav 1.000, Nikotinamid 1.000, Piridoxin hidroklorid 1.000, Riboflavin-5-foszfát, Na 0.100, Tiamin monofoszfát 1.000, i-Inozitol 2.000, D-Galaktóz 900.000, Fhenol vörös nátrium só 11.000, Nátrium piruvát 550.000 (Leibovitz, 1963)
- **Mesterséges tengervíz:** 354,7 mM NaCl, 52,4 mM MgCl₂, 9,9 mM CaCl₂, 28,2 mM Na₂SO₄, 9,4 mM KCl; pH 8
- **Pér hígító:** 200 mM glükóz, 40 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8,0 (Horváth et al., 2012)
- **Serra-féle világosító oldat:** 70%-os etanol, 40%-os formaldehid és 99,5%-os ecetsav 6:3:1 arányú keveréke
- **Szeminális plazma (ponty, pér):** sperma centrifugálva (Eppendorf 5810, Eppendorf AG, barhausenweg 1., 22339 Hamburg, Németország), 14000 Rpm-en (20817g), 5 percen keresztül, 4 °C-on, majd a felülúszó plazma pipettával összegyűjtve. (Figuerola et al., 2013)
- **Sügérfélék aktiváló oldata:** 50 mM NaCl, pH 8,0 (Lahnsteiner, 2011)
- **Tanaka hígító, módosított:** 137 mM NaCl és 76,2 mM NaHCO₃ (Szabó et al., 2005)

10.KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindenkinek, akik segítségemre voltak munkám során. Az alábbiakban azokat szeretném közülük kiemelni, akik a legtöbbet segítettek szakmailag és emberileg egyaránt.

Elsősorban témavezetőimnek, **Dr. Horváth Ákosnak** és **Dr. Urbányi Bélának** tartozom köszönettel, akik lehetőséget teremtettek a kísérleteim elvégzéséhez, és mindig fordulhattam hozzájuk a felmerülő kérdéseimmel. Maximálisan támogatták munkámat a megfelelő kutatási körülmények megteremtésével, valamint lehetőséget nyújtottak külföldi laboratóriumokban végzett vizsgálatok elvégzéséhez. Emellett nemzetközi konferenciákon, valamint továbbképzéseken való részvételemet is támogatták.

Köszönettel tartozom a Halgazdálkodási Tanszék Szaporodásbiológiai Kutatócsoport tagjainak, **Dr. Bernáth Gergelynek**, **Kollár Tímeának**, **Zoran Marinović-nak** és **Dr. Jelena Lujić-nak**, akik folyamatosan segítettek munkámat. Köszönöm **Dr. Csorbai Balázsnak**, hogy segítette a kutatócsoportunkat az intenzív haltartó rendszer üzemeltetésében. Köszönöm **Ósz Ágnesnek**, **Dr. Lefler Kinga Katalinnak** és **Dr. Bokor Zoltánnak**, hogy segítésemre voltak a terepmunkák során. Köszönöm a zebradániós labor munkatársainak, különösen **Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak** és **Gazsi Gyöngyinek**, hogy lehetővé tették a zebradánió fajban végzett vizsgálataimat. Emellett köszönettel tartozom a Halgazdálkodási Tanszék minden kollégájának, akik segítettek munkám során.

Köszönöm **Hoitsy Györgynek**, a Lillafüredi Pisztrángtelep vezetőjének, hogy számos alkalommal dolgozhattunk a telep halaival, emellett szakmai kérdésekkel is bármikor fordulhattam hozzá.

Köszönettel tartozom külföldi vizsgálataim támogatóinak, akik közreműködésére mindig számíthattam: **Dr. Juan Asturiano-nak**, a Valenciái Műszaki Egyetem Akvakultúra, Élettan és Szaporodásbiológiai csoportja vezetőjének, valamint **Dušan Jesenšek-nek**, a Tolmini Horgászegyesület vezetőjének.

A munkámat továbbá az alábbi pályázatok segítették:

- K-109847-es számú NKFI (korábbi OTKA) pályázat,

- Az Emberi Erőforrások Minisztériuma Új Nemzeti Kiválóság Programjának támogatása (Doktorjelölti ösztöndíj, ÚNKP-16-3, ÚNKP/B/2/2016),
- Short-term Scientific Mission COST Office (Food and Agriculture COST Action FA1205: *Assessing and improving the quality of aquatic animal gametes to enhance aquatic resources. The need to harmonize and standardize evolving methodologies, and improve transfer from academia to industry; AQUAGAMETE*),
- Magyarország Emberi Erőforrások Minisztériuma által finanszírozott Szent István Egyetem Kiválósági Kutatókari Pályázat – 1476-4/2016/FEKUT,
- EUREKA_HU_12-1-2012-0056 (PERCAHATCH).

Végezetül köszönöm a **családomnak**, különösen **Édesanyámnak** és **Vőlegényemnek**, hogy támogattak és biztos háttérrel nyújtottak a tanulmányaim során.