



**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

# 1. A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

## 1.1. A munka előzményei

Napjainkban a génmegőrzés szerepe növekvő fontosságú: évről évre több fajt minősítenek veszélyeztetettnek, kritikus állapotúnak vagy kihaltak, ezzel párhuzamosan a házasított fajok genetikai tartalékai a beltenyésztettség következtében folyamatosan szűkülnek. A halak a gerincesek legváltozatosabb és legnagyobb csoportja a maga 32000 – napjainkig – felfedezett fajával. A FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) információi alapján több, mint ezer vízi faj veszélyeztetett a természetes vízi halászat által. Az allélok diverzitásának megőrzésére *in situ* állománymegőrzés mellett ajánlott *ex situ in vitro* génmegőrzést is folytatni, ez az ivarsejtek mélyhűtésével kivitelezhető. A sejtek mélyhűtésével a genetikai információ hosszú távon megőrizhető. A legtöbb halfaj esetében az általánosan elterjedt spermamélyhűtési eljárás a hagyományos (lassú) fagyasztás, azonban a közelmúltban számos kutató kezdte el vizsgálni a halsperma vitrifikációját, azaz ultragyors mélyhűtését.

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. 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  $\mu$ l térfogatú folyadék fagyasztásánál a hagyományos mélyhűtés nehezen kivitelezhető, a vitrifikáció viszont megoldást jelenthet erre a problémára.

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. Ennek alapvető oka az ikra és az embrió viszonylag nagy mérete, magas hűtési érzékenysége, valamint a nagy mennyiségű szikanyag, amelybe az alacsony permeabilitású sejtmembránokon nem tud a károsodások megelőzéséhez elegendő védőanyag bejutni. Számos kutatás foglalkozik a probléma megoldásával, többek között a membráncsatornák alaposabb megismerésével és megváltoztatásával, valamint a szikanyag részleges eltávolításával. Egyre több kutató álláspontja szerint az ősvarsejtek mélyhűtése a helyettesítő megoldás. Különböző halfajokban sikeresen alkalmaztak vitrifikációt ősvarsejtek mélyhűtésére. 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. 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 embriókat vagy petesejtet tárolnának mélyhűtve.

## 1.2. Célkitűzés

Kutatásaim célja fajspecifikus sperma-vitrifikációs módszerek 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 spermatogónium (hereszövet) vitrifikációs módszereket is teszteltem zebradánió és ponty fajokban. Ezek eredményességét tripán-kék membránintegritás festéssel vizsgáltam.

## 2. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 2.1. Halsperma-vitrifikáció

A halaktól a spermát fejéssel nyertem ki. A halakat altatásban fejtem a gyakorlatban alkalmazott altatási módszertan (angolna: 60 mg/l benzokain, sügér és zebraadánió: 150 mg L<sup>-1</sup> 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 tároltam (maximum 30 percig). Az összegyűjtött sperma minőségét az aktivációt követő motilitás mérésével határoztam meg számítógépes spermavizsgálati rendszer (CASA) használatával. 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.

A spermát fajonként optimalizált izotóniás hűtőmediummal hígítottam, majd hozzáadtam a védőanyagokat különböző koncentrációban. A vitrifikációs technikák hatékonyságát műszalmás, oltókacsos és Cryotop-os módszerrel is teszteltem. Minden esetben közvetlenül folyékony nitrogénbe helyeztem az oldatot tartalmazó eszközt, előzetes nitrogéngőzben végzett hűtés nélkül. A Cryotopon és oltókacson vitrifikált szuszpenziókat közvetlenül az aktiváló oldatba helyezve olvasztottam fel, a műszalmákat vízfürdőben olvasztottam 40°C-on, 11 másodperc alatt.

A felolvasztás utáni motilitás értékek mellett zebradánió- és angolnasperma esetében a membránintegritást is vizsgáltam. Azon fajok esetében, ahol rendelkezésünkre állt megfelelő minőségű nőivarú állomány, termékenyítési tesztet végeztem. Angolna faj esetében morfológiai vizsgálatokat végeztem a vitrifikált spermiumokon.

## **2.2. Hal spermatogónium-vitrifikáció**

A hal ivari őssejtek vitrifikációs protokolljainak kidolgozásához a zebradániót és a pontyot választottam modellnek. Ezen vizsgálatok esetében az ivarszervet műtéti úton eltávolítottam a halak túlaltatását (MS-222 oldat) követően. A zebradánió esetében az ivarszervek kivételét mikroszkóp alatt végeztem. A kioperált szerveket L-15 izotóniás oldatba helyeztem. A szövetdarabokat akupunktúrás tűkre rögzítettem, majd a tűkre helyezett szöveteket kétlépéses protokoll során helyeztem a hűtőmédiumba. Számos védőanyagot teszteltünk különböző koncentrációkban és kombinációkban, kétlépéses hozzáadással: első lépés: ekvibrációs oldatba (E) helyezés (5 perc), második lépés: vitrifikációs oldatba (V) helyezés (30 másodperc).

Minden ekvibrációs médiumot minden vitrifikációs médiummal kombinálva teszteltünk. Az intracelluláris védőanyagok (metanol, propilén-glikol, dimetil-szulfoxid) mellett minden hűtőmédiumban ozmoprotektánsként trehalóz kiegészítést (0,5 M), a viszkozitás növelésére pedig fehérje kiegészítést (10% FBS), valamint 25mM Hepes kiegészítést alkalmaztunk. A felolvasztás az ozmotikus sokk minimalizálása érdekében 3 lépcsős protokoll alapján történt, csökkenő trehalóz koncentrációjú oldatokkal (10%FBS + 0,3M / 0,1M / 0M trehalóz).

## **EREDMÉNYEK**

### **2.3. Halsperma-vitrifikáció**

Összesen négy családba tartozó nyolc halfaj esetén sikerült kidolgoznom sperma-vitrifikációs módszereket. Az optimális sperma-vitrifikációs módszerek között fajonként jelentős eltéréseket találtam a védőanyag típusa és koncentrációja, valamint az optimális hűtőmedium és hígítási arány terén egyaránt (1. táblázat). 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.



1. táblázat: A különböző fajok esetében a legmagasabb, vitrifikációt követő felolvasztás után mért progresszív motilitás értékeket eredményező protokollok összefoglalása. Prog. mot.=progresszív motilitás, term.=termékenyülési arány, MOH=metanol, PG=propilén-glikol, MTX=metoxietanol.

Család	Faj	Prog. mot.	Term.	Hígítási arány	Hűtő-médium	Védő-anyag
	Pénzes pér ( <i>Thymallus thymallus</i> )	8,75±6,25 %	13,1±1 1,7%	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
	Zebradánió ( <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 10%
	Compó ( <i>Tinca tinca</i> )	3,1±0,1%		1:4	Pér hígító	MOH + 10% MTX +10% PG 15%
Sügérfélék ( <i>Percidae</i> )	Sügér ( <i>Perca fluviatilis</i> )	14±1,6%	4,9±4, 8%	1:5	Tanaka	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

### 2.3.1. Lazacfélék

Pénzes pér fajban 30% védőanyag (15% MeOH + 15% PG) felhasználásával, 1:1 hígítási aránnyal (sperma:hűtőmedium), pér szemínális 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 pèrsperma esetében szignifikánsan csökkentette a felolvasztás utáni motilitás értékeket. A vitrifikált pèrspermával 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, azonban a vitrifikált csoportban nem történt szignifikáns csökkenés a szempontos stádium és a kelés között.

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:  $78,4 \pm 23,3$  %).

Sebes pisztráng fajban 40% védőanyag (20% MeOH + 20% PG) felhasználásával, 1:1 hígítási aránnyal (sperma:hűtőmedium), pér hígítóval, Cyrotop 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:  $37,0 \pm 5,2$ %).

### 2.3.2. Pontyfélék

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 módszerrel 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. 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 morfológiailag nem mutattak eltérést a kontroll csoporttól.

Ezután különböző koncentrációjú trehalóz kiegészítéssel próbáltam javítani a fenti módszertan (10% MeOH + 10% MG + 10% PG, hűtőmedium: ponty szeminális 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.

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. 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:  $81,0 \pm 28\%$ ) mértem, mint a 0,8 M, 0,2 M és 0 M trehalóz kiegészítés esetén.

### 2.3.3. Sügérfélék

Sügér fajban 30% védőanyag (15% metanol + 15% propilén-glikol) 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 (metanol és propilén-glikol 1:1 arányú keveréke) között nem találtam szignifikáns különbséget, azonban 40% védőanyag hozzáadásakor a felolvasztás utáni progresszív motilitás szignifikánsan csökkent. 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.

### 2.3.4. Angolnafélék

Első lépésként membránfestéssel (SYBR-14/PI) vizsgáltam 4 különböző sperma-vitrifikációs módszer hatékonyságát. 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. 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.

Európai angolna fajban 40% védőanyag (20% MeOH + 20% PG) felhasználásával, 1:1 hígítási aránnyal (sperma:hűtőmedium), ponty szemínális 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.

## **2.4. Hal spermatogónium-vitrifikáció**

Zebradánió faj esetében mind a kilenc tesztelt vitrifikációs módszer különböző mértékben bizonyult alkalmasnak a spermatogóniumok 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.

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

## **2.5. 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, zebraadánió, csapó sügér, európai angolna esetében, a módszerek hatékonyságát három faj esetében (zebraadánió, 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 zebraadánió fajok esetében.

## 3. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

### 3.1. Halsperma 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) 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 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, mivel a vitrifikációt követően a spermiumok mozgása inkább rezgésszerű, mint progresszív. A jelenség 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 morfometriai elemzésének eredményei is bizonyítják, mivel a vitrifikált-felolvasztott spermiumok fejének kerülete és területe nem csökkent szignifikánsan a friss sperma értékeihez képest.

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 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.

A vitrifikáció eredményességének 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.

### **3.2. Hal spermatogóniumok vitrifikációja**

A hereszövetek mélyhűtve tárolásával, majd a felolvasztott szövetből történő spermatogónium 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 erre a célra alkalmasnak találtam zebradánió és ponty fajokban. A tük egyedileg jelölhetőek, valamint kriocsövekben vagy sínekre rögzített gobletekben tárolhatóak felolvasztásig.



A vitrifikációt követően sikeresen izoláltam spermatogóniumokat ponty és zebradánió faj esetében egyaránt.

A spermatogóniumok vitrifikációjával megőrizhetővé válik mindkét ivar genomja, így kiváltható a nem mélyhűthető hal ikra és embrió megőrzése. Az utóbbi években különböző halfajokban sikeresen alkalmaztak vitrifikációs protokollokat ősvarsejtek megőrzése során. Egy 2017-ben megjelent cikkben medaka teljes hereszövet sikeres vitrifikációját írták le. Ugyanez a japán kutatócsoport korábban teljes hal védőanyagmentes mélyhűtése után izolált sikeresen élő ősvarsejteket kiolvasztást követően a hal ivarszervéből, 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.

### **3.3. 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 spermaminták 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.

## **Az értekezés témakörében megjelent közlemények**

### Tudományos közlemények folyóiratban

**Kása E**, Bernáth G, Kollár T, Žarski D, Lujić J, Marinović Z, Bokor Z, Hegyi A, Urbányi B, Vílchez MC, Morini M, Peñaranda DS, Pérez L, Asturiano JF, Horváth A. DEVELOPMENT OF SPERM VITRIFICATION PROTOCOLS FOR FRESHWATER FISH (EURASIAN PERCH, *Perca fluviatilis*) AND MARINE FISH (EUROPEAN EEL, *Anguilla anguilla*). *General and Comparative Endocrinology*, (Fish Gametes Special Issue) 245, 102-107. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.05.010

**Kása E**, Bernáth G, Kollár T, Lujić J, Marinović Z, Urbányi B, Di Chiacchio, I., Horváth Á. VITRIFICATION OF FISH SPERM: INVESTIGATION THE SUPPOSED POSITIVE EFFECT OF TREHALOSE. *Cryobiology*, 2016, 73(3):409. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2016.09.044 (published abstract from the CRYO2016 conference)

Lujić J., Marinović Z., Sušnik Bajec S., Djurdjević I., **Kása E.**, Urbányi B., Horváth Á. 2017. First successful vitrification of salmonid ovarian tissue. *Cryobiology*, 76, 154-157. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.005

### Konferencia kiadványban megjelent közlemények

**Eszter Kása**, Jelena Lujić, Zoran Marinović, Tímea Kollár, Béla Urbányi, Ákos Horváth: Vitrification of Zebrafish (*Danio rerio*) spermatogonia for

gene conservation purposes. Magyar Laborállat-tudományi Egyesület Nemzetközi Tudományos Ülés, 2017. május 25. Budapest, Állatorvostudományi Egyetem

**KÁSA ESZTER, LUJIC JELENA, MARINOVIC ZORAN, KOLLÁR TÍMEA, URBÁNYI BÉLA, HORVÁTH ÁKOS:** Opportunities of gene conservation in Zebrafish (*Danio rerio*): sperm- and gonadal stem cell vitrification. (poster presentation) 22th Conference on Animal Reproduction, Kecskemét, Hungary, 11-12. November 2016, Book of abstracts p. 27. (In Hungarian)

**Kása E, Bernáth G, Kollár T, Žarski D, Lujčić J, Marinović Z, Bokor Z, Hegyi A, Urbányi B, Vilchez MC, Morini M, Peñaranda DS, Pérez L, Asturiano JF, Horváth A.** VITRIFICATION OF FISH SPERM. (oral presentation) 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Ancona, Italy, 7-11. September 2015, Book of abstracts p. 106-107.

**Kása E, Bernáth G, Kollár T, Lujčić J, Marinović Z, Urbányi B, Di Chiacchio, I., Horváth Á.** VITRIFICATION OF FISH SPERM: INVESTIGATION THE SUPPOSED POSITIVE EFFECT OF TREHALOSE. (oral presentation) CRYO2016: 53rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ottawa, Canada, 23-27. July 2016, Book of abstracts p. 26-27.

**Eszter Kasa , Dusan Jesensek , Gergely Bernath , Timea Kollar , Zoltan Bokor , Bela Urbanyi , Akos Horvath.** Vitrification of the sperm of salmonid species. The 22nd International Congress of Zoology, Okinawa, Japan, 14-19. November 2016, Book of abstracts p. 73.

**Kása E.**, Bernath G., Kollar T., Zarski D., Lujic J., Marinovic Z., Bokor Z., Hegyi A., Urbanyi B., Horvath A.: Vitrification of the sperm of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) VII International Conference „Water and Fish”, June 10-12. 2015.p.

**Eszter Kása**, M. C. Vílchez, M. Morini, D. S. Peñerada, L. Pérez, J. F. Asturiano, B. Urbányi, Á. Horváth: Vitrification of the sperm of European eel *A. Anguilla*: Investigation of different protocols. Aquaculture Europe 14, Donostia-San Sebastián, Spain, 14-17 October 2014, Book of abstracts p. 64

Akos Horvath, **Eszter Kasa**, Juan F Asturiano . Sperm cryopreservation and vitrification of aquatic species. The 22nd International Congress of Zoology, Okinawa, Japan, 14-19. November 2016, Book of abstracts p. 22.

## **Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó közlemények**

### Tudományos közlemények folyóiratban

Zoran Marinović, Jelena Lujčić, **Eszter Kása**, Gergely Bernáth, Béla Urbányi, Ákos Horváth: 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:10.1016/j.ygcen.2016.07.005

Bernáth, G., Bokor, Z., **Kása, E.**, Várkonyi, L., Hegyi, Á., Kollár, T., Urbányi, B., Žarski, D., Radóczy Ifj., J., and Horváth, Á. (2015). Comparison of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca*

fluviatilis) sperm. Cryobiology 70, 76–78.

Bokor, Z., Beráth, G., **Kása, E.**, Várkonyi, L., Hegyi, Á., Kollár, T., Urbányi, B., Zarski, D., Radóczy, J., Horváth, Á. (2015). The effectiveness of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. Fishing, vol.108/3, p. 25-29. (In hungarian)

Bernáth, G., Zarski, D., **Kása, E.**, Staszny, Á., Várkonyi, L., Kollár, T., Hegyi, Á., Bokor, Z., Urbányi, B., and Horváth, Á. (2016). Improvement of Common Carp (*Cyprinus carpio*) Sperm Cryopreservation Using a Programable Freezer. General and Comparative Endocrinology, Fish Gametes Special Issue (Accepted, in press) doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2016.08.013>

Zoran Marinović, Jelena Lujčić, **Eszter Kása**, Gergely Bernáth, Béla Urbányi, Ákos Horváth: 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.

Szentes Katalin, **Kása Eszter**, Urbányi Béla, Csorbai Balázs, Szabó Tamás, Borbély Gyula, Mészáros Erika, Bernáth Gergely, Tóth Gábor és Horváth Ákos: Induced and natural maturity and sex reversion of barramundi (*Lates calcarifer*) raised in intensive system. Fishing, Vol. 106/3 (2013) p. 23-26. (In hungarian)

Tímea Kollár, **Eszter Kása**, Zsolt Csenki-Bakos, Árpád Ferincz, Béla Urbányi, Ákos Horváth: Development of an in vitro toxicological test system based on zebrafish (*Danio rerio*) sperm analysis. 10th European Zebrafish Meeting, Budapest, Hungary, 3-7. July 2017, book of abstracts p. 369.

Zoran Marinovic, Jelena Lujic, **Eszter Kása**, Tímea Kollár, Zsolt Csenki, Béla Urbányi, Ákos Horváth: Cryopreservation of spermatogonia of different zebrafish lines by whole testes needle immersed vitrification. 10th European Zebrafish Meeting, Budapest, Hungary, 3-7. July 2017, book of abstracts p. 321.

Lujić J, Marinović Z, Djurdjevic, I., Susnik, S., Snoj, A., **Kása, E**, Urbányi B, Horváth, Á. Slow-rate freezing of brown trout gonadal tissue for improved population management. (oral presentation) CRYO2016: 53rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ottawa, Canada, 23-27. July 2016, Book of abstracts p. 41-42.

Katalin Szentes, Tamás Szabó, Balázs Csorbai, Gyula Borbély, Gergely Bernáth, **Eszter Kása**, Béla Urbányi, Gábor Tóth, Ákos Horváth: Effects of hormonal induction on gonad development of freshwater-reared Asian sea bass *Lates calcarifer* AQUACULTURE 2013 - "Strike a Chord for Sustainable Aquaculture" Nashville, Tennessee, USA 22-25. Febr. 2013. Book of abstracts p. 1075.

G. Bernath, Z. Bokor, T. Kollár, **E. Kása**, L. Várkonyi, Á. Hegyi, B. Urbányi, Á. Horváth: The comparison of two different methods in the

cryopreservation of Eurasian perch *Perca fluviatilis* sperm. Aquaculture Europe 14, Donostia-San Sebastián, Spain, 14-17 October 2014, Book of abstracts p. 21.

Tímea Kollár, Gergely Bernáth, Zsolt Csenki-Bakos, Róbert Kovács, **Eszter Kása**, Béla Urbányi, Ákos Horváth: Development of cryopreservation of Zebrafish *Danio rerio* sperm. Aquaculture Europe 14, Donostia-San Sebastián, Spain, 14-17 October 2014, Book of abstracts p. 21.

M. C. Vilchez, Juan F. Asturiano, M. Morini, D. S. Peñerada, L. Pérez, A. Depincé, **E. Kása**, C. Labbé, Á. Horváth: Comparison of two validated methods for cryopreserving European eel *A. Anguilla* sperm: Standardization as a target. Aquaculture Europe 14, (oral presentation) Donostia-San Sebastián, Spain, 14-17 October 2014, Book of abstracts p. 21.

Bernáth G, **Kása E**, Szentes K, Staszny A, Várkonyi L, Kollár T, Hegyi A, Bokor Z, Urbányi B, Horváth A. IMPROVEMENT OF COMMON CARP (*Cyprinus carpio*) SPERM CRYOPRESERVATION: THE APPLICABILITY OF A CONTROLLED-RATE FREEZER AS A STANDARD DEVICE. (oral presentation) 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Ancona, Italy, 7-11. September 2015, Book of abstracts p. 98-99.

Horváth A, Bernáth G, Bokor Z, **Kása E**, Ósz A, Urbányi B, Cabrita E, Gavaia P, Snoj A, Bravničar N, Jesenšek D. PROGRESS TOWARDS STANDARDIZATION OF CRYOPRESERVATION METHODS FOR



SALMONID SPECIES OF THE ADRIATIC DRAINAGE BASIN. (oral presentation) 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Ancona, Italy, 7-11. September 2015, Book of abstracts p. 100-101.

Vílchez, M. C., Morini M., Peneranda, D. S., Pérez, L., Depincé, A., **Kása, E.**, Labbé, C., Horváth, Á., Asturiano, J. F. (2014): Cryopreserving European eel (*A. anguilla*) sperm: comparison of two methods for standardization. (Oral presentation) V. Jornadas Ibéricas de Ictiología. Lisboa, Portugal, 2014. 06. 24-27. Book of abstracts P 105.

Marinović Z, Lujčić J, **Kása, E**, Bernáth, G, Urbányi B, Horváth, Á. Slow-rate freezing of tench and goldfish testicular cells and tissue. CRYO2016: 53rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ottawa, Canada, 23-27. July 2016, Book of abstracts p. 117.

Szentes K., Szabó T., Csorbai B., Borbély G., Bernáth G., **Kása E.**, Urbányi B., Tóth G., Horváth Á.: Hormone induction and early sex inversion of the asian sea bass, *Lates calcarifer*, reared in a freshwater intensive system Domestication in Finfish Aquaculture 23-25.10.2012. Olsztyn, Poland. Book of abstracts p. 53.

Katalin Szentes, Ákos Horváth, Tamás Szabó, Balázs Csorbai, Gyula Borbély, Gergely Bernáth, **Eszter Kása**, Béla Urbányi, Vojtěch Kašpar, Martin Pšenička: Morphology and ultrastructure of Asian sea bass (*Lates calcarifer*) spermatozoa. 10th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish. Olhão, Portugal, 25-30 May 2014. Abstract book p. 112.

Jelena Lujić, Gergely Bernáth, Zoran Marinović, Tímea Kollár, **Eszter Kása**, Vladica Simic, Miroslav Ćirković, Béla Urbányi, Ákos Horváth. The effect of extenders and cryoprotectants on various parameters of cropreserved tench Tinca Tinca sperm. Donostia-San Sebastián, Spain, 14-17 October 2014.

Bernáth G., Bokor Z., Žarski D., **Kása E.**, Kollár T., Várkonyi L., Hegyi Á., Urbányi B., Horváth Á.: Out of season quality assesment and cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. VII International Conference „Water and Fish”, June 10-12. 2015. p. 178.