



A HALSPERMA VIZSGÁLATÁRA ALAPOZOTT TOXIKOLÓGIAI TESZTRENDSZEREK KIALAKÍTÁSA

KOLLÁR TÍMEA

Gödöllő

2018

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola
tudományága: Mezőgazdaság-tudomány
alprogram: Halbiológia és halgazdálkodás
vezetője: Dr. Mézes Miklós (MHAS)
egyetemi tanár, az MTA rendes tagja
Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Állattudományi Alapok Intézet
Takarmányozástani Tanszék

Témavezetők: Dr. Horváth Ákos (PhD)
tudományos főmunkatárs
Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imre (PhD)
tudományos munkatárs
Szent István Egyetem
Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

.....

Dr. Mézes Miklós
iskolavezető jóváhagyása

.....
Dr. Horváth Ákos
témavezető jóváhagyása

.....
Dr. Csenki-Bakos Zsolt Imre
témavezető jóváhagyása

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	5
1.1 Célkitűzések.....	7
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	9
2.1 A halsperma biológiája.....	9
2.1.1 A spermium morfológiája.....	9
2.1.2 A halsperma összetétele.....	11
2.1.3 A spermium mozgásának élettana.....	12
2.2 A halspermát érhető károsodások és azok vizsgálata.....	14
2.2.1 A halsperma mozgásának vizsgálata.....	17
2.2.1.1 <i>A zebradánió-sperma vizsgálata</i>	19
2.2.1.2 <i>A pontysperma vizsgálata</i>	21
2.2.2 A halsperma termékenyítőképességének vizsgálata.....	21
2.2.2.1 <i>A termékenyülés folyamata és az embriogenezis</i>	21
2.2.2.2 <i>Termékenyítés</i>	24
2.2.3 A halsperma koncentrációjának vizsgálata.....	25
2.3 Toxikológiai tesztrendszerek.....	26
2.3.1 A zebradánió és ponty mint modellszervezetek.....	28
2.3.2 Az <i>in vitro</i> tesztrendszerek.....	29
2.3.3 A spermium toxikológiai célú vizsgálata.....	30
2.3.3.1 <i>Emlős spermán végzett toxikológiai vizsgálatok</i>	30
2.3.3.2 <i>Tengeri sün fajban végzett sperma- és embriotoxicitási vizsgálatok</i>	31
2.3.3.3 <i>A halspermium toxikológiai célú felhasználása</i>	33
2.4 A disszertációban vizsgált toxikus anyagok általános bemutatása.....	36
2.4.1 Króm.....	37
2.4.2 Cink.....	37
2.4.3 Réz.....	37
2.4.4 Kadmium.....	38
2.4.5 Nikkel.....	38
2.4.6 Higany.....	38
2.4.7 Arzén.....	38
3. ANYAG ÉS MÓDSZER	40
3.1 Kísérleti állomány.....	40
3.1.1 Zebradánió.....	40
3.1.2 Ponty.....	41
3.2 Spermavétel.....	42
3.2.1 Zebradánió.....	42
3.2.2 Ponty.....	42
3.3 A sperma minőségének ellenőrzése.....	44
3.4 Tesztanyagok.....	45
3.5 A sperma hígítása és kitettsége.....	46
3.6 Toxikológiai célú spermavizsgálat.....	47

3.7	A termékenyülés, valamint az embriogenezis vizsgálata zebradánióban.....	48
3.7.1	Ikragyűjtés.....	48
3.7.2	Termékenyítés.....	49
3.8	Statisztikai elemzés.....	51
4.	EREDMÉNYEK.....	53
4.1	Toxikológiai célú spermavizsgálat.....	53
4.1.1	A nehézfémek sperma progresszív motilitására (PMOT) gyakorolt hatása.....	53
4.1.1.1	<i>Zebradánió</i>	53
4.1.1.2	<i>Ponty</i>	55
4.1.2	A nehézfémek spermiumok sebességére (VCL) gyakorolt hatása.....	57
4.1.2.1	<i>Zebradánió</i>	57
4.1.2.2	<i>Ponty</i>	59
4.1.3	A nehézfémek spermiumok mozgásának az egyenestől való eltérésére (LIN) gyakorolt hatása.....	62
4.1.3.1	<i>Zebradánió</i>	62
4.1.3.2	<i>Ponty</i>	64
4.2	A termékenyülés és az embriogenezis vizsgálata.....	66
4.2.1	Króm.....	66
4.2.2	Cink.....	68
4.2.3	Réz.....	70
4.2.4	Kadmium.....	71
4.2.5	Nikkel.....	73
4.2.6	Higany.....	74
4.2.7	Arzén.....	76
5.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK.....	78
5.1	Toxikológiai célú spermiumvizsgálat.....	78
5.2	A termékenyülés és az embriogenezis vizsgálata.....	82
5.3	Általános következtetések.....	87
5.4	Javaslatok.....	88
6.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	89
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	90
8.	SUMMARY.....	92
9.	MELLÉKLETEK.....	94
M1.	Irodalomjegyzék.....	94
M2.	A halak tartásához használt rendszervízben található fontosabb ionok koncentrációi....	111
M3.	A kísérletek során használt törzsoldatok koncentrációja és azok ozmolalitása.....	112
10.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	113

1. BEVEZETÉS

A tudományos célból évente felhasznált gerinces állatok számát 100 millióra becsülik (BAUMANS 2005). Az Európai Bizottság hetedik jelentése szerint 2013-ban az Európai Unió területén mintegy 11,5 millió gerinces állatot használtak fel állatkísérletek során. Éppen ezért az EU célja, hogy a 3R-stratégia révén (Reduction, Replacement, Refinement, azaz Csökkentés, Helyettesítés, Finomítás) csökkentse a tudományos célból felhasznált állatok számát, és olyan alternatív módszerekkel helyettesítse a gerinces állatokon végzendő kísérleteket, melyek megbízható és könnyen extrapolálható eredményeket adnak. Fontos továbbá a felhasznált állatok szenvedésének minimálisra csökkentése, valamint a kísérletek körülményeinek sztenderdizálása, melynek révén az eredmények laboratóriumok közötti összehasonlítása megvalósulhat, mely szintén a csökkentés elvét szolgálja. Ennek alapgondolatát már 1959-ben megfogalmazta Russel és Burch közös munkájában (The Principles of Humane Experimental Technique).

Az etikai és gyakorlati előnyeik, valamint költséghatékonyságuk miatt az *in vitro* tesztrendszerek napjainkban széleskörben elterjedtek az ökotoxikológiai vizsgálatokban is. Mindazonáltal a Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organisation for Economic Co-operation and Development, azaz OECD) számos toxikológiai vizsgálatokra vonatkozó útmutatót adott ki, melyek a xenobiotikumok ártalmas hatásának tesztelésére szolgálnak, melyekben a kísérletek körülményei minden részletükben sztenderdek. A halak fontos modellszervezetek az ökotoxikológiai vizsgálatokban, mivel vízhez kötött életmódjukból kifolyólag a leginkább ki vannak téve a környezeti ártalmaknak (KIME 1999), ezért ezen irányelvekben a zebraadánió (*Danio rerio*), valamint a ponty (*Cyprinus carpio*) fel vannak tüntetve a kísérletekhez javasolt modell szervezetekként. A halsperma pedig a könnyen, gyorsan és objektíven mérhető paramétereire miatt (antioxidáns válasz, motilitási paraméterek, életképesség stb.) igen jó *in vitro* toxikológiai modell lehetne, ami ráadásul szükségtelenné teszi az élő állatok toxikus expozícióját; ennek ellenére a halsperma vizsgálata egyik toxikológiai szabványban sincs megemlítve. A halspermát viszont – az általánosan használt *in vitro* sejt kultúrákkal ellentétben – nem szükséges fenntartani, hanem bármikor, frissen, nem invazív módon kinyerhető a donor egyedből, ezáltal toxikológiai tesztekben való alkalmazása kevesebb idő-, munkaerő- és anyagi ráfordítással jár.

Számos kísérletről számoltak be az elmúlt években, melyekben halspermát használtak toxikológiai modellként, de a leírt módszerek számos aspektusban különböznek egymástól. Egyik fő különbség a kísérletekben használt, spermát szolgáltató hal faja. A legtöbb esetben nagytestű, ezáltal nagy mennyiségű egyedi spermát szolgáltató halfajokkal dolgoztak, mint például tokfélékkel (Acipenseridae, LI et al. 2010ac, DIETRICH et al. 2012, HULAK et al. 2013,

LINHARTOVA et al. 2013, 2014, SHALIUTINA et al. 2017), afrikai harcsával (*Clarias gariepinus*, KIME et al. 1996, RURANGWA et al. 1998, 2002, LAHNSTEINER et al. 2004, EBRAHIMI 2007), csapósügérrel (*Perca fluviatilis*, HATEF et al. 2010, 2011), szivárványos pisztránggal (*Oncorhynchus mykiss*, BILLARD és ROUBAUD 1985, LAHNSTEINER et al. 2005, DIETRICH et al. 2010, KUTLUYER et al. 2015, 2016), valamint ponttyal (CHYB et al. 2000, 2001ab, RURANGWA et al. 2002, ZHOU et al. 2006, SAROSIEK et al. 2009, LI et al. 2010b, DIETRICH et al. 2011). Zebradánió-sperma *in vitro* toxikológiai célú felhasználásáról azonban alig áll rendelkezésre irodalmi adat (REINARDY et al. 2013, ACOSTA et al. 2016). Másik fontos különbség a kísérletek során vizsgált végpontok között mutatkozott: az antioxidáns enzimek aktivitása (ZHOU et al. 2006, EBRAHIMI 2007, SAROSIEK et al. 2009, LI et al. 2010abc, GAZO et al. 2013, KUTLUYER et al. 2015, 2016, SHALIUTINA et al. 2017) az egyik legtöbbet tanulmányozott változó, emellett pedig a kromatin állomány épsége is sokat vizsgált (DIETRICH et al. 2005, 2007, GAZO et al. 2013).

A halsperma motilitási paramétereinek toxikológiai célú vizsgálatával kapcsolatban is számos publikáció született eddig, azonban ezek sem egységesek (HATEF et al. 2013): a legtöbb esetben a kérdéses paraméterek vizsgálata a kezelést követően csak egy adott időpontban, a toxikus expozíció végén történt, ezen esetekben tehát nem áll rendelkezésre részletes információ az időhatás összefüggésekről (BILLARD és ROUBAUD 1985, KIME et al. 1996, CIERESZKO és DABROWSKI 2000, CHYB et al. 2000, 2001ab, RURANGWA et al. 2002, ROSETY et al. 2003, VAN LOOK és KIME 2003, ABASCAL et al. 2007, ROCHA et al. 2017). Az ugyanazon fajban és toxikus vegyületekkel elvégzett vizsgálatok eredményei pedig olykor ellentmondásosak, az eltérő kísérleti körülmények és technikai részletek miatt (DIETRICH et al. 2011, HAYATI et al. 2017).

A tengeri sün (*Paracentrodus lividus*) spermáját széleskörűen használják ökotoxikológiai vizsgálatokban (VOLPI GHIRARDINI és ARIZZI NOVELLI 2001, VOLPI GHIRARDINI et al. 2001, LERA et al. 2006) a vízben jelenlévő szennyezőanyagok káros hatásának kimutatásához. Ez a módszer minden részletében sztenderdizált (EPA 2009), ezáltal a kapott eredmények összehasonlíthatóak. Ezen tesztek során viszont nem közvetlenül a sperma minőségében bekövetkező változásokat vizsgálják, hanem a terhelt spermával termékenyítenek, és a fejlődő embriókban megjelenő deformitásokat és fejlődésbeli rendellenességeket detektálják. A módszer hátránya, hogy a petesejtek esetleges rossz minősége torzíthatja az eredményeket, valamint a szennyezett spermával történő termékenyítés során maguk a petesejtek is – körülbelül 20 percnyi időtartamra - kontaktusba kerülnek a vizsgált szennyezőanyaggal, így a fejlődésben megjelenő bármilyen elváltozást okozhatja a petesejt rövid idejű expozíciója is, így nem csupán a

spermiumokra kifejtett direkt hatás nyilvánul meg a kapott eredményeken. Mindazonáltal a tengeri sünn tengervízben él és szaporodik, tehát ezen teszt nem adaptálható édesvízi körülményekre.

Érhetik azonban olyan károsodások a spermiumokat toxikus expozíció esetén (pl. oxidatív DNS-károsodás), amik esetleg a sperma motilitási paramétereiben nem nyilvánulnak meg, azonban a termékenyítés után a fejlődő embriókban komoly deformitásokat és rendellenességeket okozhatnak, így ezek vizsgálata is kiemelt fontosságú (NAGY et al. 2016).

1.1 Célkitűzések

Doktori munkám során célul tűztem ki gyors, egyszerűen kivitelezhető és megismételhető, a halsperma vizsgálatán alapuló sztenderd *in vitro* toxikológiai tesztrendszer kidolgozását, amely kiküszöböli a különböző kísérletek közötti technikai eltéréseket, és lehetővé teszi a különböző laboratóriumokban végzett spermavizsgálatok és mérések összehasonlítását. Vizsgálataimat zebradánió és ponty fajokban végeztem el, a vizsgált paraméterek a következők voltak különböző expozíciós idők mellett: a sperma progresszív motilitása (PMOT, %), a spermiumok mozgásának sebessége (VCL, $\mu\text{m/s}$), a mozgás egyenestől számított eltérése (LIN, %), valamint zebradánió esetében a terhelt spermával végzett termékenyülés aránya (%), az embriók 48 órás korában vizsgált túlélése (%), valamint a kialakuló embrionális deformitások aránya (%). Kísérleteim során hét különböző nehézfém, a króm, cink, kadmium, nikkel, réz, arzén, valamint higany hatását vizsgáltam a fent említett paraméterekre. Kutatásaim során az alábbi kérdésekre kerestem választ:

- Megjelenik-e dózis-hatás, illetve idő-hatás összefüggés a vizsgált paraméterekben a nehézfémekkel történő kezelések hatására, vagyis a koncentráció, valamint expozíciós idő növelésével arányosan változnak-e a vizsgált értékek?
- Dózis-hatás fennállása esetén lehetséges-e félhatásos koncentrációk (EC_{50} -értékek) kiszámítása a különböző vizsgált paraméterekre, vagyis a toxikus anyagok hatására bekövetkező változás a vizsgált paraméterekben eléri-e a kontroll értékekhez viszonyított 50%-os mértéket?
- Ugyanazt a vizsgálati módszert alkalmazva zebradánió és ponty fajban, a kapott eredmények szignifikánsan különböznek-e egymástól?
- Nehézfémeknek kitett spermával termékenyítve a zebradánió embriók termékenyülési százaléka, valamint a későbbiekben túlélő embriók aránya elmarad-e a kontroll csoporttól, illetve megjelennek-e deformitások vagy fejlődésbeli elmaradások a kontroll csoporthoz viszonyítva?

- A sperma *in vitro* kitettséget követően a motilitásvizsgálat során, vagy pedig a termékenyítési kísérletek során kapott eredmények bizonyulnak érzékenyebb vizsgálati végpontnak?

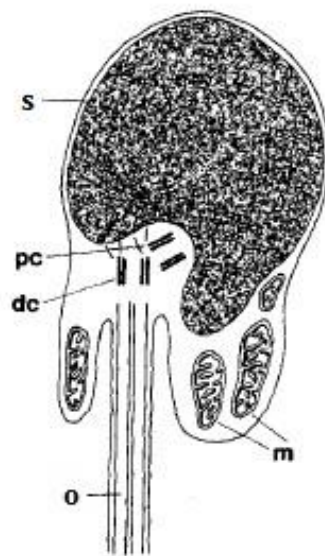
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1 A halsperma biológiája

2.1.1 A spermium morfológiája

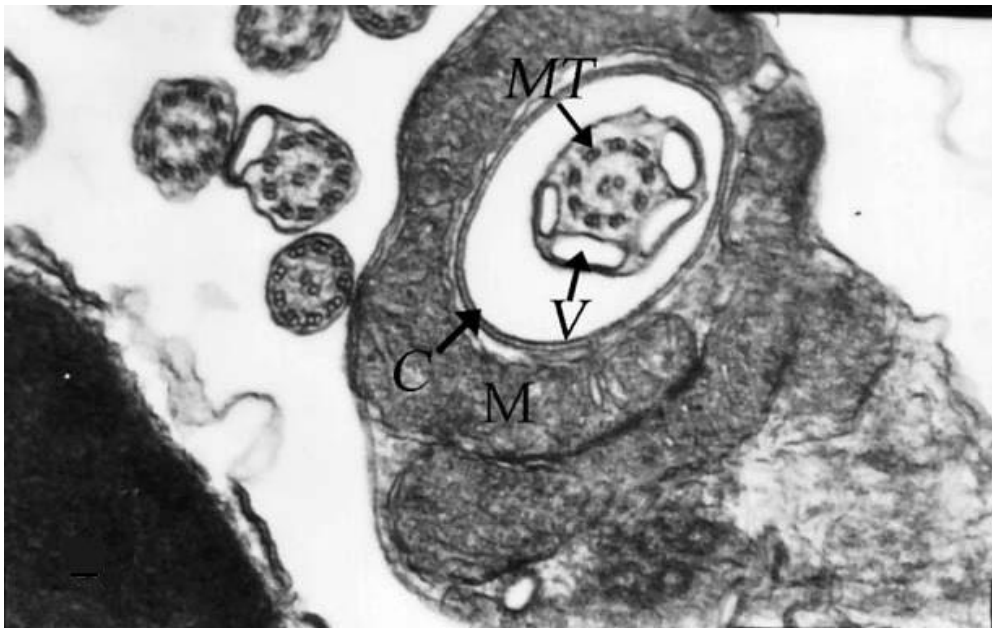
A spermium egy speciális feladatot, a megtermékenyítést ellátó, leegyszerűsödött sejtípus. Az emlősökkel ellentétben a halak spermiumai – kivéve a tokalakúak (Acipenseriformes) rendjének fajait – nem rendelkeznek működő akroszómával, mivel a sajátos szaporodásbiológiai tulajdonságaik miatt nincs rá szükség, így az evolúció során eltűnt (CIERESZKO et al. 2000a). Néhány halfaj, pl. a sebes pisztráng (*Salmo trutta*), valamint a gébfélék (Gobiidae) családjába tartozó *Lepadogaster lepadogaster* esetében a gametogenezis során megfigyeltek egy ideiglenes akroszómaszerű struktúrát, mely az érett spermiumban már nem található meg (MATTEI és MATTEI 1978, BILLARD 1983).

A valódi csontoshalak (Teleostei) jellegzetes spermiumtípusának a pontyfélék (Cyprinidae) hímivarsejtjei tekinthetők (1. ábra). A spermium feje gömbölyű, átmérője 1,5-2,5 μm , amely tartalmazza a szintén gömbölyű, vagy elliptikus sejtmagot. A spermium feje a fark tengelyéhez képest excentrikusan, oldalra eltolódva helyezkedik el (BACCETTI et al. 1984). A sejtmag és a fark közötti összeköttetést biztosítja a centriólum. A proximális centriólum közvetlenül a nukleusz mögött, a farktengellyel 120-125°-os szöget bezárva helyezkedik el, a disztális centriólum pedig hátrébb, a farktengellyel egy vonalban található (ZHANG et al. 2014). A halak spermiumai, az emlős spermiumokkal ellentétben, nem rendelkeznek kifejezett középdarabbal.



1. ábra: A halspermiumok felépítésének illusztrációja. s=sejtmag, pc=proximális centriólum, dc=disztális centriólum, m=mitokondriumok, o=ostor (BACCETTI et al. 1984).

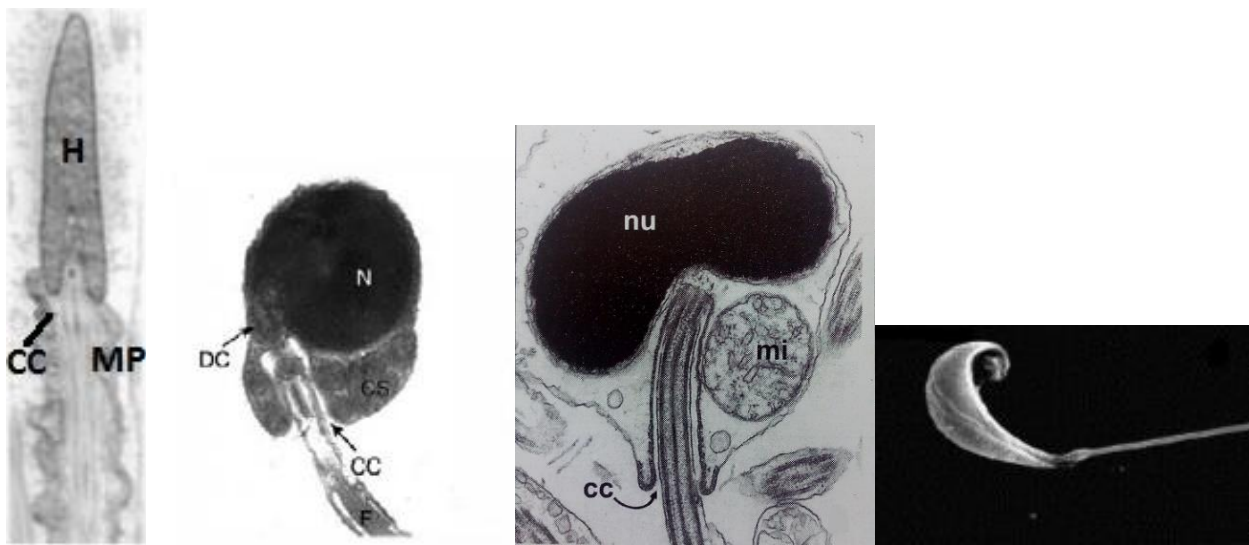
A spermium ostora, vagy flagelluma biztosítja a sejt mozgási képességét, melynek hossza 30-60 μm lehet (ISLAM és AKHTER 2011). A flagellum hosszanti irányban elhelyezkedő mikrotubulusok csoportjából, az axonémából áll, melynek közepén 2 darab egyszeres, a szélein pedig 9 darab kettős mikrotubulus fut végig (2. ábra). A flagellumot a nukleusz után, a fark tövénél citoplazmatikus kitüremkedés (úszó) veszi körül, melyben 2-10 darab mitokondrium található. Ezek feladata a mozgáshoz szükséges energia biztosítása. A farktengely töve és a citoplazmatikus kitüremkedés között ún. postnuclearis, vagy citoplazmatikus csatorna fut (HORVÁTH 2018).



2. ábra: A spermium flagellumának keresztmetszete ponty (*Cyprinus carpio*) fajban transzmissziós elektronmikroszkópos felvételen (40 000 \times -es nagyítás). M: mitokondrium, MT: mikrotubulusok, C: citoplazmatikus csatorna, V: vakuólumok (MASSAR et al. 2011).

A halak spermiumai azonban nagyon változatos morfológiai tulajdonságokkal bírhatnak halfajtól függően, ennek oka a megtermékenyítés módjának változatosságában rejlik (NAGAHAMA 1983) (3. ábra). A spermium feje nemcsak gömbölyű lehet, hanem enyhén megnyúlt (pl. lazacfélék (*Salmonidae*)), vagy akár sarló alakú is (pl. angolnafélék, (*Anguillidae*)) (COWARD et al. 2002, COLAK és YAMAMOTO 1974). A spermium fejének átmérője pedig belső megtermékenyítésű (introsperm) fajoknál elérheti akár a 10 μm -t is (LAHNSTEINER és PATZNER 2008). A spermium fejében található sejtmag alakja szintén nagy változatosságot mutat a spermato-, illetve spermiogenezis komplexitásától függően (BILLARD 1990). A spermium közepdarabja introsperm fajoknál akár 2-4 μm hosszú is lehet, míg külső megtermékenyítésű (aquasperm) fajoknál gyakran teljesen hiányzik (JAMIESON 1991). Lazacfélék esetében a közepdarab mitokondrium-gyűrűvé egyszerűsödik, míg pontyban és csukában (*Esox lucius*) módosulatlan centrioláris komplexum figyelhető meg (LAHNSTEINER és PATZNER 2008). A

flagellum hossza csatornaharcsánál (*Ictalurus punctatus*) akár 90 μm is lehet, ráadásul az Apogon nembe tartozó fajokhoz hasonlóan több flagellummal is rendelkezik (MATTEI és MATTEI 1984). Az axonémát felépítő 9+2-es komplex jellemző szinte az összes halfaj spermiumára, de pl. az angolnaalakúak (Anguilliformes) és a gyíkfejűhal-alakúak (Elopiformes) esetében a centrális mikrotubulusok nélküli, 9+0-s struktúra alakult ki. A citoplazmatikus kitüremkedésben található mitokondriumok száma és elhelyezkedése szintén halfajtól függő: introsperm fajok esetén számos, míg az európai angolna (*Anguilla anguilla*), valamint a csapósügér esetében pedig egyetlen darab mitokondrium található: angolnában a spermium fejének csúcsán, míg sügérspermiumban a középdarab tartalmazza (ISLAM és AKHTER 2011).



3. ábra: Különböző halfajok spermiumainak mikroszkópos felvétele, balról jobbra haladva a szivárványos guppi (*Poecilia reticulata*), a zebraadánió (*Danio rerio*), a fehérdurobincs (*Diplodus sargus*), valamint az európai angolna (*Anguilla anguilla*) spermiuma látható. H=spermiumfej, CC=citoplazmatikus csatorna, MP=középdarab N, nu=nukleusz, DC=distalis centrilum, CS=citoplazmatikus kitüremkedés, F=flagellum, mi=mitokondrium (COWARD et al. 2002, ZHANG et al. 2013, LAHNSTEINER és PATZNER 2008, MARCO-JIMÉNEZ et al. 2006).

2.1.2 A halsperma összetétele

A halak spermája magukból a hímivarsejtekből, valamint a szemínális plazmából tevődik össze, mely utóbbi a here és a spermavezeték szekrétuma (CIERESZKO et al. 2000b). A szemínális plazmában jelen lévő spermiumok száma, vagyis a halsperma koncentrációja fajfüggő, valódi csontosahalak esetében általában 2×10^6 és $5,3 \times 10^{10}$ spermium/mL között változik (LEUNG és JAMIESON 1991). Pontyban koncentráltabb, $38 \pm 4 \times 10^9$ spermium/mL-es értéket figyeltek meg (SHALIUTINA-KOLESOVA et al. 2016), zebraadánióban pedig ennél kevésbé koncentráltat, $9 \pm 4 \times 10^7$ spermiumot milliliterenként (TAN et al. 2010).

A szemínális plazma funkciója optimális környezet biztosítása a spermiumok számára, továbbá azok védelme a proteolitikus és oxidatív károsodásokkal szemben (CIERESZKO 2008).

A halak szeminális plazmája, ellentétben az emlősökével, kevés proteint és egyéb szerves anyagot tartalmaz (pl. hormonok, feromonok, koleszterin, glicerin, vitaminok, szabad aminosavak, cukrok, citromsav, zsírok). Főként szervetlen vegyületekből áll, melyek közül a nátrium-, kálium-, valamint kloridionok vannak jelen a legnagyobb mennyiségben (LINHART et al. 1991). Ezek koncentrációja meghatározza a sperma ozmolalitását, melynek értéke pontyfélék esetében 290-300 mOsm/kg körüli (ALAVI et al. 2006). Ezenkívül cink és bórionok is előfordulhatnak a szeminális plazmában minimális, mikromoláris mennyiségben. Ezek funkciója nem teljesen tisztázott; a cinknek valószínűleg a fehérjék foszforilációjában van szerepe, ami a spermiumok mozgásának beindulásához szükséges (CIERESZKO et al. 2000b).

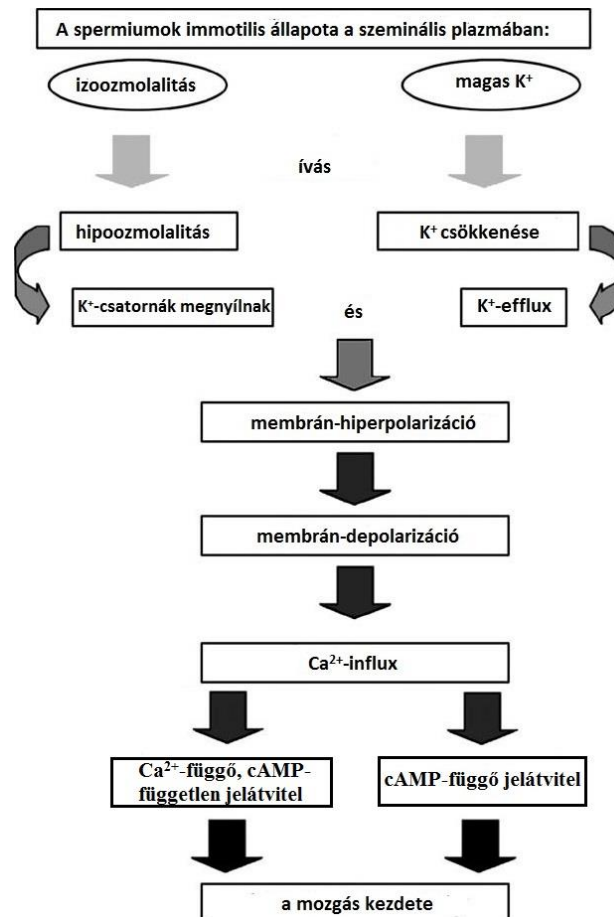
2.1.3 A spermium mozgásának élettana

A hímivarsejtek a szeminális plazmában mozdulatlanok. Az ivarsejtek végső érése és mozgási képességük kialakulása akkor megy végbe, amikor keresztülhaladnak a here kanyarult csatornarendszerén és az ondóvezetéken (MORISAWA és MORISAWA 1990). Az immotilis állapot fenntartásáért a spermiumok és a szeminális plazma között fennálló izoozmolalítás felelős, valamint lazacfélék esetében a szeminális plazma magas K^+ -tartalma (ALAVI és COSSON 2006).

Az introsperm fajok az ovariális folyadékból nyerik a spermiumok mozgásához szükséges energiát, míg az aquasperm fajok endogén energiaraktárakat használnak fel a mozgáshoz. Az édesvízi halfajok általában monoszacharidból, leginkább fruktózból állítják elő a spermiumok mozgásához szükséges energiát, ám guppi esetében megfigyeltek glikogén, vagyis poliszacharid hasznosítást (ANDERSON és PERSONNE 1970), lazacfélékben pedig lipid raktározást is (LAHNSTEINER et al. 1998). A fruktóz glikolízise, majd a fehérjék oxidatív foszforilációját követően adenzin-trifoszfát (ATP) keletkezik, melynek hidrolízise energiafelszabadulással járó folyamat. A folyamat során adenzin-difoszfát (ADP) képződik, melynek katalizátor enzime a dinein ATPáz, mely a flagelláris mozgást indukálja (INGERMANN 2008).

Édesvízi fajok esetében az ívás során, amikor a hímivarsejtek vízbe, vagyis hipoozmotikus közegbe kerülnek, a sejt K^+ -csatornái megnyílnak, és a spermiumból K^+ -kiáramlás következik be az izoozmotikus állapot helyreállítása érdekében. Lazacfélékben a sejten kívüli tér K^+ -koncentrációjának lecsökkenése indukálja ezt a folyamatot, míg a többi csontoshal-faj esetében ez nem kizárólag a K^+ -koncentrációtól, hanem az ozmolalítás csökkenésétől függ. Ennek következtében a sejtmembrán hiperpolarizálódik, aminek depolarizációja érdekében Ca^{2+} áramlik a sejt belsejébe. Ezzel párhuzamosan az axonémában található fehérjék foszforilálódnak az ATP-termelés érdekében, és a flagellum mikrotubulusait összekötő dinein karok aktiválódnak. Mindez a spermiumok mozgásának beindulásához vezet (ALAVI és COSSON 2006) (4. ábra). Tengeri halfajok esetében a spermium vízbe jutva hiperozmotikus közegbe kerül (~1000 mOsm/kg), ahol

a vízcsatornákon (akvaporinokon) keresztül vizet ad le, ami miatt a sejten belüli térben az ionok koncentrációja megnövekszik. Ez szintén a motilitás beindulásához vezet (COSSON et al. 2008). Lazacfélék és tokfélék esetében ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP)-függő a folyamat, mely segít a plazmamembrán hiperpolarizációja következtében kialakuló membránpotenciált a flagellumba továbbítani, míg a többi édesvízi és tengeri halfajban Ca^{2+} -függő és cAMP-független (KRASZNAI et al. 2000).

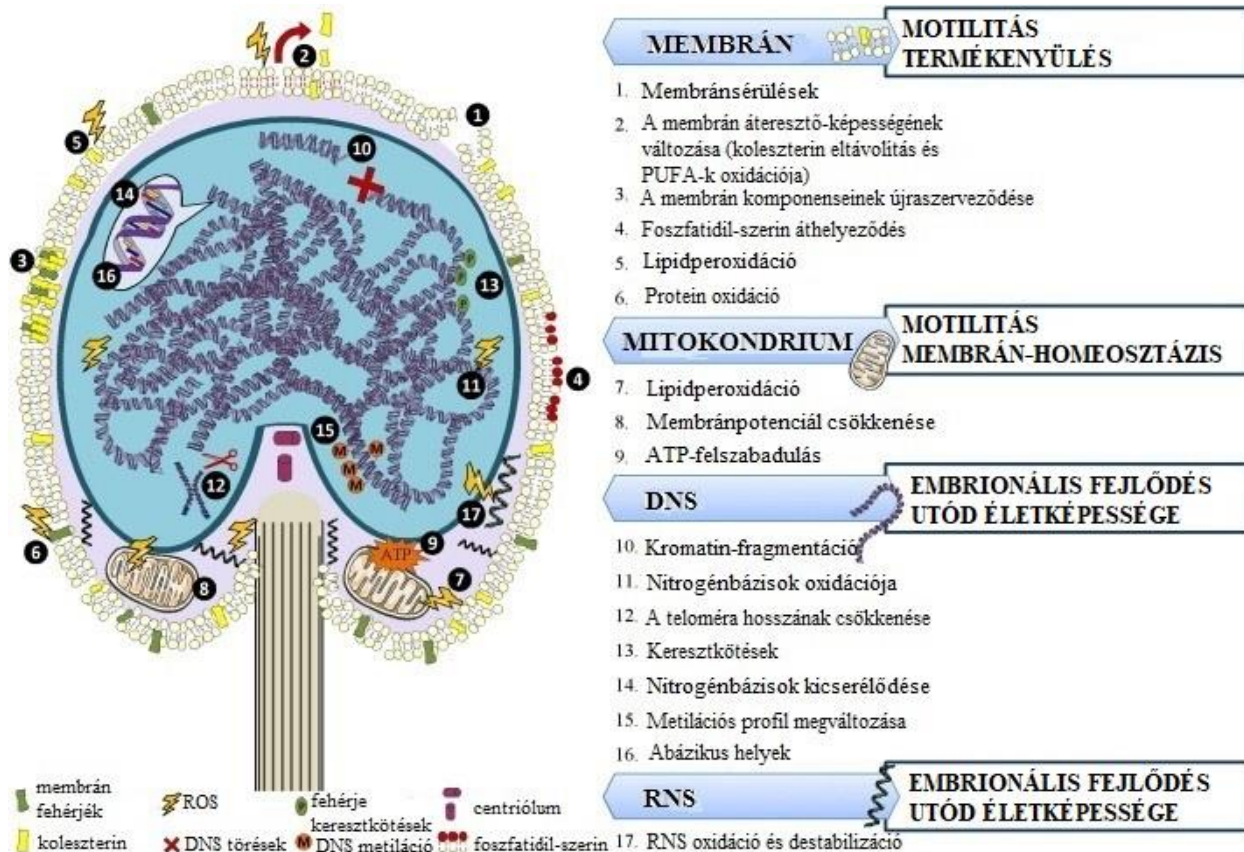


4. ábra: Az édesvízi halfajok spermiumainak motilissá válásának folyamatábrája. Jobboldalon a lazacfélékre (Salmonidae), baloldalon a többi édesvízi halfajra, középen pedig a mindkét csoportra jellemző folyamat lépései láthatóak (ALAVI és COSSON 2006 nyomán).

Mivel a halak spermiumában kevés mitokondrium található, ami az energiát szolgáltatná, ezért az ATP-raktárak hamarabb kiürülnek, mint ahogyan az energia újratermelődné. Ennek következtében az intenzív mozgás időtartama csupán 30-40 másodperc, 1-2 percen belül azonban teljesen meg is szűnik (BILLARD és COSSON 1992).

2.2 A halspermát érhető károsodások és azok vizsgálata

A halak spermiumait – külső megtermékenyítésű fajok lévén – számos károsodás érheti, melyek hatással lehetnek a sperma motilitási és termékenyítési képességére, valamint az esetleges termékenyülés után kihathatnak az embrionális fejlődésre, illetve az utódok túlélésére (5. ábra).



5. ábra: A halspermiumok károsodásának fő típusai (1-17.), melyek megjelenhetnek a sejtmembránon (1-6.), a mitokondriumokban (7-9.), a DNS-ben (10-16.), valamint az RNS-ben (17.). Ezek az elváltozások hatással lehetnek a motilitásra (1-9.), a termékenyülésre (1-6.), az embrionális fejlődésre (10-17.), valamint az utódok életképességére (10-17.) (CABRITA et al. 2014 nyomán).

A halspermium feji részének membránja többszörösen telítetlen zsírsavakból (PUFA) áll, mely nagyfokú érzékenységet mutat az oxidatív károsodásokkal szemben (CIERESZKO 2000). Oxidatív károsodást okozhatnak pl. bizonyos toxikus anyagok, hipoxiás, valamint hiperoxiás állapotok, illetve különböző oxidatív ágensek (pl. H_2O_2 , O_3) (LIVINGSTONE 2003). Az oxidatív károsodás lényege, hogy reaktív oxigén szabadgyökök (ROS) képződnek, melyek miatt lipidperoxidáció lép fel. A lipidperoxidáció a sejtmembrán, valamint az akvaporinok (vízszállító fehérjék) károsodását okozza, melynek eredményeként a sejtmembrán permeabilitása fokozódik, így az intracelluláris térben bekövetkező ozmolalitás-változás következtében a sejt elveszíti mozgási képességét (SHALIUTINA-KOLESOVA et al. 2014). Ezzel párhuzamosan, a lipidek

oxidációja következtében malondialdehid (MDA) keletkezik, melynek citotoxikus hatása miatt a DNS károsodik. Az érett spermium azonban nem képes kijavítani a DNS-állományban bekövetkező károsodásokat (OLSEN et al. 2005). A toxikus nehézfémek, mint például az ólom, réz és nikkel, valamint a peszticidek képesek közvetlenül a spermium DNS-állományát is károsítani (OLIVA 2006).

Az antioxidánsok védelmet nyújthatnak az oxidatív károsodásokkal szemben. Az enzimatisz antioxidáns rendszer elemei közül halak esetében a glutation-peroxidáz (GSH-Px) kiemelendő. A szelén-függő glutation rendszer a citoszolban, valamint a mitokondriumokban található (FLOHÉ 1989), így a GSH-Px mennyisége a halspermában oxidatív károsodás esetén *in vitro* is képes megemelkedni. Emelett a kataláz és a szuperoxid-dizmutáz is fontos antioxidáns enzimek. A nem enzimatisz antioxidáns védelmi rendszer elemei a glutation, flavonoidok és bizonyos vitaminok. Vitaminok közül az A-, C-, valamint E-vitamin rendelkezik antioxidáns aktivitással, viszont a halak szervezete egyiket sem képes szintetizálni, ezért bevitelüket külső forrásból, táplálék útján kell biztosítani (DABROWSKI és CIERESZKO 1996).

A metallotioneinek olyan alacsony molekulatömegű fémkötő fehérjék, melyek az egyik legfontosabb antioxidánsok az állati szervezetekben. Alapvetően az esszenciális fémek (pl. cink) szervezeten belüli transzportjában játszanak fontos szerepet, de nehézfém-toxikózis hatására mennyiségük kismértékben meg tud emelkedni a spermában is, hogy a szabad nehézfém-ionokat megkössék (FABRIK et al. 2008). Általánosságban azonban elmondható, hogy a spermiumok antioxidáns ellátottsága nagyon csekély (MÉZES MIKLÓS szóbeli közlése, 2014). Éppen ezért a hímivarsejtek motilitási paraméterei érzékeny és pontos bioindikátorai lehetnek a vízi szennyezéseknek (KIME 1999).

A spermát érhető károsodások vizsgálatára számos módszer áll a rendelkezésünkre, melyek segítségével megállapíthatóak a spermiumok különböző struktúráiban bekövetkező változások (1. táblázat). Ezek az elváltozások végső soron befolyásolhatják a sperma motilitási képességét, mely kihat a termékenyülés sikerére, vagy a DNS-állomány károsítása esetén az utódok fejlődésében manifesztálódhatnak.

1. táblázat: A halsperma minőségének mérésére leggyakrabban alkalmazott eljárások (CABRITA et al. 2014 nyomán)

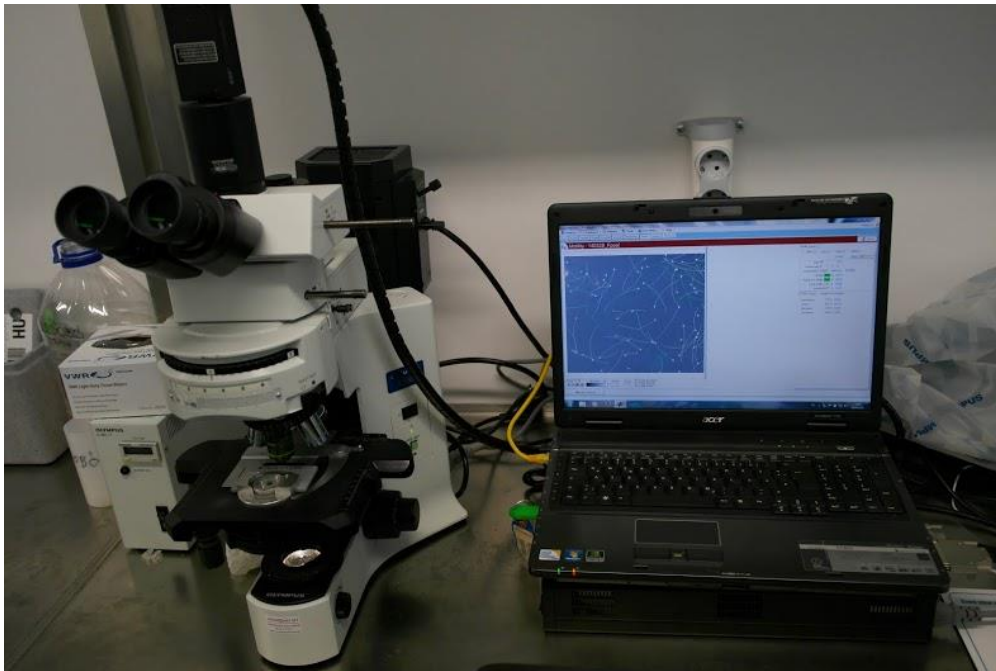
Vizsgált paraméter	Eljárás	Hatás helye	Hivatkozás
Plazmamembrán-integritás	Próbák: Hoechst, PI/SYBR-14, akridin narancs, DAPI, eozin, tripán kék, YO-PRO1	Plazma membrán	CABRITA et al. 2009
Enzimaktivitás	Litikus enzimek: foszfatázsav, alkalikus foszfatáz (LD-glükoronidáz) Metabolikus enzimek: malát-dehidrogenáz, laktát-dehidrogenáz, aszpartát-amino-transzferáz, adenosin-trifoszfátáz (ATP-áz)	Sperma Szeminális plazma	LAHNSTEINER et al. 1998 LAHNSTEINER et al. 1998
Hipo-, vagy hiperozmotikus duzzadás	HOS teszt (Hypoosmotic Swelling Test)	Plazma membrán	CABRITA et al. 2009
Spermium motilitás	CASA, stroboszkópos multiexpozíciós fényképezés, szubjektív értékelés fénymikroszkóppal	Sperma	RURANGWA et al. 2004; COSSON et al. 2008
ATP-metabolizmus	ATP- és ADP-szint, kreatin-foszfát, ATP-áz, adenilát-kináz	Sperma	LAHNSTEINER et al. 1998
Mitokondriális működés	Próbák: JC1, Rhodamine 123; MitoTracker MTT assay	Mitokondrium Mitokondrium	CABRITA et al. 2005a,b; LIU et al. 2007 AZIZ 2006
Spermium morfológiája	Elektronmikroszkóp, ASMA (Automatizált Spermium Morfometria Analízis)	Spermium	MARCO-JIMÉNEZ et al. 2006
Oxidatív stressz	Antioxidáns enzimek: kataláz, glutation-peroxidáz (GSH-Px), szuperoxid-dizmutáz Antioxidáns potenciál	Szeminális plazma Szeminális plazma	MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2012a,b MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2013a,b
Lipid-peroxidáció	Szabadgyökök: dihidroetídium-DHE assay, diklorofluoreszcín-DCF assay Malondialdehid (MDA) meghatározás (TBARS assay), 8-izoprosztán szint Fluoreszcens festékek: C11-BODIPY	Szeminális plazma Spermium Spermium	PÉREZ-CEREZALES et al. 2010a,b; HAGEDORN et al. 2012 MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2012a,b; KHOSROWBEYGI és ZARGHAMI 2008 HAGEDORN et al. 2012
Fehérje oxidáció	Karbonilcsoport (DNPH-2,4-dinitrofenilhidrazin reakció)	Spermium	MARTÍNEZ-PÁRAMO et al. 2012a,b
DNS-töredezetttség és oxidáció	COMET assay (fluoreszcens in situ hibridizációval (FISH) vagy endonukleázokkal, vagy ezek nélkül) TUNEL assay Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA) OxiDNA assay (8-oxoguanin assay) Termékenyítési teszt	Kromatin Kromatin Kromatin Sperma	CABRITA et al. 2009; PÉREZ-CEREZALES et al. 2009 CABRITA et al. 2011a,b EVENSON et al. 1999 CAMBI et al. 2013 CABRITA et al. 2009

2.2.1 A halsperma mozgásának vizsgálata

A halsperma motilitása az egyik legfontosabb mutatója a sperma minőségének. Számos publikációban számoltak be arról, hogy a motilitás szoros korrelációban áll a termékenyítőképességgel (KIME et al. 2001, RURANGWA et al. 2004, ALAVI & COSSON 2005). Ezen paraméter vizsgálata történhet mikroszkópos becsléssel, ami csupán szubjektív minősítésre ad lehetőséget, ezáltal nagy gyakorlatot igényel. Multiexpozíciós fényképezéssel, valamint videofelvételek készítésével lehetővé válik a mozgás objektívebb értékelése, ám ezek a technikák nagy utómunkát igényelnek, így nem alkalmasak a sperma minőségének valós idejű megállapítására.

Napjainkban legelterjedtebb a Számítógépes Spermavizsgáló Rendszer (Computer-assisted Sperm Analysis, CASA) alkalmazása (6. ábra), melyet a halsperma vizsgálata során is széleskörűen alkalmaznak (KIME et al. 2001). Segítségével a sperma motilitási paramétereinek gyors, precíz és valós idejű meghatározása válik lehetővé. Ennek lényege, hogy egy 10-20 \times -os nagyítású negatív fáziskontraszt-objektívvel rendelkező mikroszkóppal felvételt készítünk a vizsgálandó mintáról, amelyet a digitális kamera közvetít a számítógéphez. A számítógépen található szoftver egyesével detektálja a mikroszkóp látóterében lévő spermiumokat, és rögzíti azok mozgási útvonalát. Kiszámolja a hímivarsejtek különböző mozgási paramétereit (2. táblázat, 7. ábra), majd az értékek alapján kategorizálja őket progresszíven, lokálisan, körkörösén, egyenesen, nem egyenesen mozgó, valamint immotilis csoportokba (HORVÁTH et al. 2006). Az egyesével számított értékek átlaga alapján meghatározhatóak a különböző motilitási paraméterek az egész mintára vonatkoztatva, melyek a program memóriájában mentésre kerülnek, így később bármikor előhívhatóak. Az analízis során fontos, hogy a spermiumok egy rétegben jelenjenek meg a mikroszkóp látóterében, és függőleges irányba ne tudjanak elmozdulni. Ehhez speciális kamrák (pl. Makler kamra), valamint eldobható, kapilláris elven működő tárgylemezek állnak rendelkezésre (pl. Leja, MicroCell, CellVision, Cell-Vu).

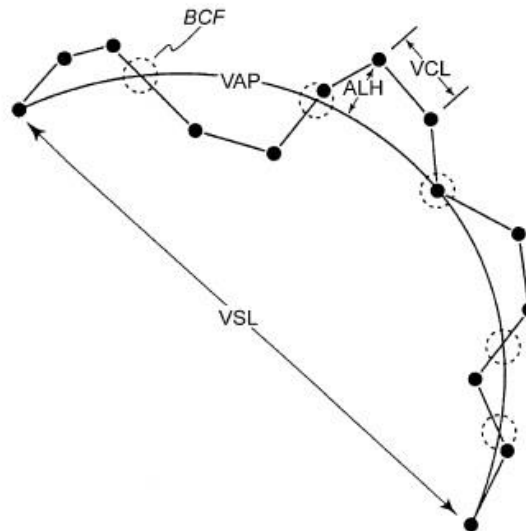
A halsperma motilitásvizsgálata során kétlépcsős hígításra van szükség. A fejest követően a spermát 1-100 \times -os arányban hígítjuk olyan oldattal, melynek ozmolalitása, valamint K⁺-koncentrációja megegyezik a spermáéval, így segít az immotilis állapot fenntartásában. Közvetlenül a sperma vizsgálata során végezzük el a második hígítást, 1-20 \times -os arányban, melynek során édesvízi fajok esetében olyan hipoozmotikus oldatokat, illetve vizet alkalmazunk, melyek segítenek a spermiumok motilissá válásában (BILLARD és COSSON 1992).



6. ábra: A Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén található Számítógépes Spermavizsgáló Rendszer (CASA) (Fotó: Kása Eszter).

2. táblázat: A Számítógépes Spermavizsgáló Rendszerek (CASA) által leggyakrabban rögzített sperma motilitási paraméterek (HORVÁTH et al. 2006).

Rövidítés	Angol név	Jelentés	Mértékegység	Számítás
MOT	motility	motilitás	%	mozgó sejtek száma/összes sejt
PMOT	progressive motility	progresszív, előrehaladó mozgás	%	progresszíven mozgó sejtek száma/összes sejt
DSL	straight line distance	a kiindulási és végpont közötti egyenes távolság hossza	μm	
DCL	curvilinear distance	a ténylegesen megtett, teljes útvonal hosszúsága	μm	
DAP	distance of average path	a ténylegesen megtett, teljes útvonal és az egyenes távolság hosszának átlaga	μm	
VSL	straight line velocity	sebesség a kiindulási és végpont közötti egyenes távolságra (DSL) számolva (progresszív sebesség)	$\mu\text{m/s}$	
VCL	curvilinear velocity	sebesség a ténylegesen megtett, teljes útvonalra (DCL) számolva	$\mu\text{m/s}$	
VAP	average path velocity	sebesség a mozgás átlagolt útvonalára (DAP) számítva	$\mu\text{m/s}$	
LIN	linearity	a ténylegesen megtett, teljes útvonalnak az egyenes távolságtól számított eltérése	%	$\text{VSL/VCL} \times 100$
STR	straightness	az átlagolt útvonalnak az egyenes távolságtól számított eltérése	%	$\text{VSL/VAP} \times 100$
WOB	wobble	a ténylegesen megtett, teljes útvonalnak az átlagolt útvonaltól való eltérése	%	$\text{VAP/VCL} \times 100$
BCF	beat cross frequency	a fej kilengésének frekvenciája	Hz	
ALH	amplitude of lateral head movement	a fej oldalirányú kitérésének átlagos nagysága	μm	



7. ábra: A spermium különböző motilitási paramétereinek illusztrációja. VAP=átlagolt útvonalra számított sebesség, VSL=egyenes útvonalra számított sebesség, VCL=ténylegesen megtett útvonalra számított sebesség, BCF=a fej kilengésének frekvenciája, ALH=a fej oldalirányú kilengésének átlagos nagysága (RURANGWA et al. 2004).

A motilitási paraméterek automatikus detektálása miatt fontos odafigyelni azokra a tényezőkre, melyek a mérés pontosságát torzíthatják. A szoftverbe betáplálhatóak azok a méretbeli határértékek, amelyek alapján a rendszer érzékeli a spermiumokat, így az esetleges szennyeződések és egyéb sejteket nem fogja hímivarsejtként azonosítani. További probléma lehet a hímivarsejtek letapadása a tárgylemezre, ami könnyen megakadályozható az aktiváló oldathoz 1% koncentrációban hozzáadott poli(vinil-alkohol) (CHAPEAU et GAGNON 1987), vagy szarvasmarha szérum albumin (BSA) alkalmazásával (HARRISON et al. 1982). A spermiumok esetleges sodródását az aktiváló oldatban a szoftver tényleges mozgásként érzékelheti, ami szintén torzíthatja az eredményeket, ezért ezek kiszűrése is hangsúlyos. A halspermiumokra jellemző rövid mozgási időtartam miatt pedig kiemelten fontos, hogy a felvételek az aktivációt követően azonnal, pár másodpercen belül készüljenek. A minél pontosabb eredmények érdekében ajánlatos egy analízis során több aktivációt is elvégezni, aktivációnként pedig több felvételt is készíteni.

2.2.1.1 A zebradánió-sperma vizsgálata

A különböző halfajok sajátos spermatológiai tulajdonságai, kiváltképp a szeminális plazma eltérő összetétele miatt, minden egyes halfaj esetében optimalizálni kell a sperma motilitásvizsgálata során használatos immobilizáló, valamint aktiváló oldatokat, illetve az azokkal elvégzett hígítások arányát.

Zebradánió esetében Jing et al. (2009) optimalizálta a sperma aktivációját, gyűjtési módját, hígítását és tárolását. A kísérleteik során a spermát minden esetben 300 mOsm/kg ozmolalítású

Hanks-féle sóoldatban (8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,16 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 0,2 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,06 g Na_2HPO_4 , 0,06 g KH_2PO_4 , 0,35 g NaHCO_3 , 1 g glükóz 1000 ml desztillált vízben, pH=7,5, HANKS 1949) immobilizálták. Az aktiválás tekintetében arra a megfigyelésre jutottak, hogy nincs szignifikáns különbség a kezdeti motilitási értékekben desztillált víz, 0,3%-os NaCl-oldat, valamint 170 mOsm/kg ozmolalitású Hanks-féle sóoldat alkalmazásával, azonban desztillált vízzel aktiválva a spermiumok tovább mozognak.

A spermagyűjtést tekintve megállapították, hogy az egyedek fejésével kisebb mennyiségű (0,8-2,0 μL /egyed) és kevésbé koncentrált sperma nyerhető ki, mint a here sebészi úton történő eltávolításával, azonban a sperma motilitása szignifikánsan magasabb volt a fejést követően ($90 \pm 4\%$), mint a here kimetszésével és pépesítésével ($65 \pm 13\%$). Fejés alkalmazása esetén ajánlatos több egyedtől származó, kevert mintával dolgozni az ivartermék mennyiségének maximalizálása érdekében. Ezenkívül az állatvédelmi szempontokat is figyelembe véve a fejés támogatandóbb.

A sperma tárolása során megfigyelték, hogy a szobahőmérsékleten (25°C -on) tárolt minták motilitása sokkal gyorsabban csökkent, mint a 4°C -on tároltaké: 10 óra tárolás után a szobahőmérsékletű minták motilitása $20 \pm 14\%$ volt, szemben a hűtött mintákkal, ahol ugyanez a paraméter $65 \pm 7\%$ -os értéket mutatott. A hígítási arányokat vizsgálva azt tapasztalták, hogy nagyobb hígítási arány (1:50-1:500 sperma: hígító (v/v)) alkalmazása esetén a sperma motilitása gyorsabban csökken a tárolási idő függvényében, mint alacsonyabb fokú hígítást alkalmazva (1:10, 1:20 sperma: hígító (v/v)).

Wilson-Leedy et al. (2009) különböző koncentrációjú NaCl-oldatok zebradánió-sperma motilitásra és sebességre kifejtett hatását vizsgálta. Kísérleteik során a spermát zebradánió immobilizáló oldatba (140 mM NaCl, 10 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 20 mM HEPES, pH=8,5) fejték. Megállapították, hogy csapvízzel, valamint 40 mM NaCl-oldattal aktiválva érhető el az aktivációt követő 10 másodperc után a legnagyobb motilitás, melytől követően fokozatosan csökkent. Az aktiváló oldat NaCl-koncentrációját növelve (80, 100, 120 mM) alacsonyabb kezdeti motilitási értékeket figyeltek meg, azonban az értékek az aktivációt követően növekedni kezdtek, majd végig stagnáltak az azt követő 120 másodperc során, szemben a csapvízzel, amivel már az aktivációt követő 80 másodperc után közel 0%-ra csökkent a motilitás. A sebességet (VCL) vizsgálva azonban nem volt megfigyelhető ez a különbség az aktiváló oldatok között: ez az érték az aktivációt követően fokozatosan csökkent, függetlenül az aktiváló oldat összetételétől, azonban 80, illetve 100 mM NaCl-oldat esetében a VCL értéke kisebb ütemben csökkent a csapvízhez, valamint a 40 mM NaCl-oldathoz viszonyítva.

Kollár (2013) különböző aktivációs oldatok hatását vizsgálva hasonló megfigyelésre tett szert. A spermát a zebradániók tartására használt rendszervízzel, valamint desztillált vízzel aktiválva nem mutatkozott szignifikáns különbség: mindkét típusú vízzel aktiválva kezdeti magas

motilitási érték mutatkozott (60-70%), ami az egy perces vizsgálati periódus végéig ugyanolyan mértékben csökkent le (10-20%). Pontyféle aktiváló oldat (45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris, pH=8,0, SAAD és BILLARD 1987) alkalmazásával azonban megfigyelték, hogy a kezdeti alacsonyabb motilitási értékek (30-40%) nem csökkentek számottevően az egy perces vizsgálati idő alatt. Két immobilizáló oldat, a 300 mOsm/kg ozmolalitású Hanks-féle sóoldat, valamint a pontyféle immobilizáló oldat (200 mM KCl, 30 mM Tris, pH=8,0, SAAD és BILLARD 1987) összehasonlítása során nem tapasztaltak szignifikáns különbséget az egy perces vizsgálati periódus alatt.

2.2.1.2 A pontysperma vizsgálata

A pontysperma hígítása során is széleskörűen használják az előbbieken részletezett pontyféle immobilizáló oldatot (PERCHEC et al. 1995ab). Ringer oldatban (6,5 g NaCl, 0,14 g KCl, 0,12 g CaCl₂, 0,2 g NaHCO₃, 0,01 g NaH₂PO₄, 2 g glükóz 1000 mL desztillált vízben) pedig 4 °C-on akár 10 napig is eltartható a sperma anélkül, hogy veszítene motilitási képességéből (SNEED és CLEMENS 1956). Woynarovich-oldatot (0,3% urea, 0,4% NaCl, WOYNAROVICH 1962) is elterjedten alkalmaznak: 5:3 arányban (sperma: hígító (v/v)) hígítva és hűtve tárolva akár 45 órán át eltartható benne a sperma anélkül, hogy veszítene termékenyítési képességéből a hígítatlan spermához képest (HULATA és ROTHBARD 1979). Saad et al. (1988) azonban a pontysperma 10 napos tárolását vizsgálva arra a megfigyelésre tett szert, hogy az 1:10 arányban (sperma: hígító (v/v)) szeminális folyadékkal, illetve sóoldattal (125 mM NaCl, 0,1 mM CaCl₂, 20 mM Tris, pH=8,0) hígított sperma termékenyítőképessége drasztikusan lecsökken a hígítatlan spermához viszonyítva.

Aktiváló oldatok közül hipotóniás oldatok széles választéka áll rendelkezésre: elterjedten alkalmazzák ponty esetében is a már korábban említett pontyféle aktiváló oldatot (PERCHEC et al. 1995ab), valamint desztillált víz, avagy csapvíz is alkalmas a spermiumok aktiválására.

2.2.2 A halsperma termékenyítőképességének vizsgálata

2.2.2.1 A termékenyülés folyamata és az embriogenezis

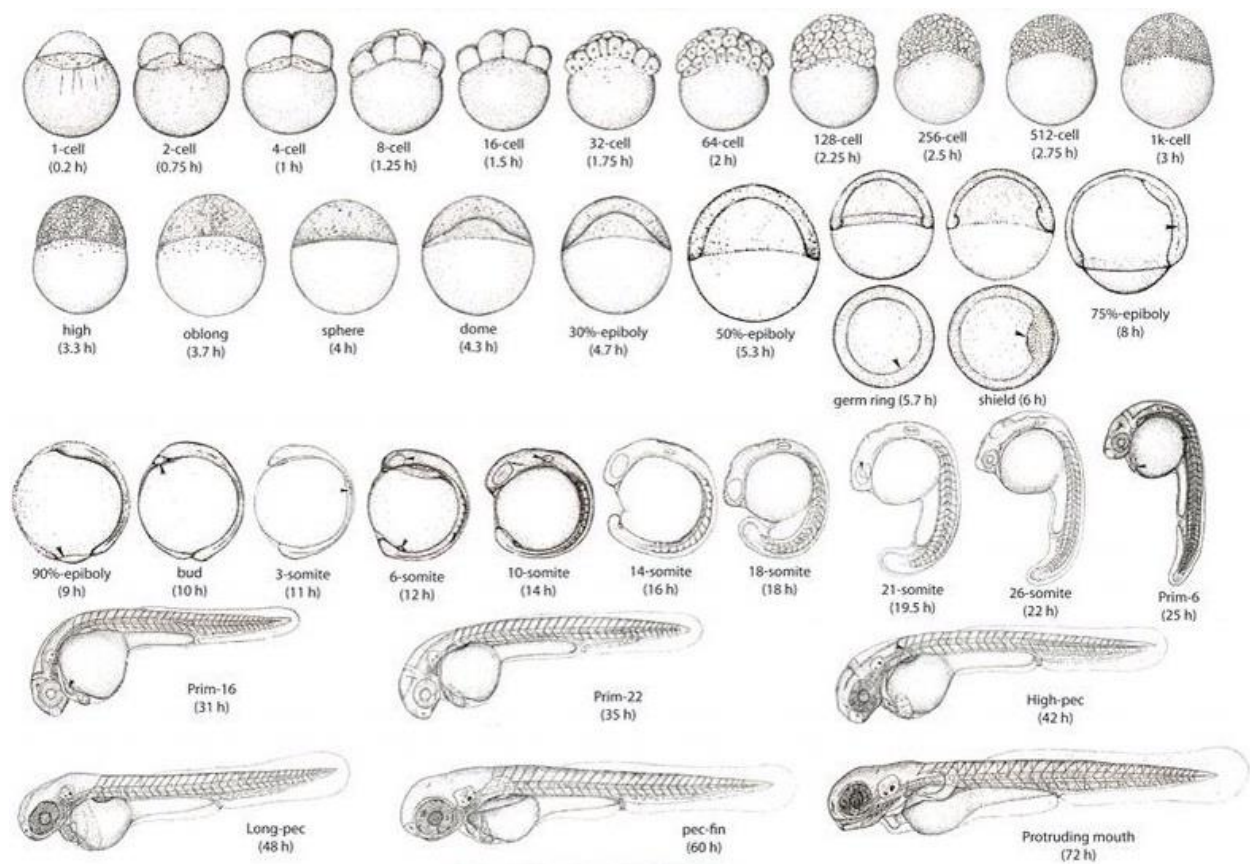
A halak esetében előfordul belső megtermékenyítés, főleg a porcoshalaknál, mely során a termékenyülés az anya testén belül történik. A megtermékenyített ikrát a nőtény leadhatja azonnal (zigopar), vagy csak az embriók bizonyos fejlettségi állapotának elérése után (ovovivipar), mely esetben az utódok a petevezető módosult szakaszában fejlődnek, azonban táplálékot nem kapnak. Vivipar fajok esetében az utódok az uterusban vagy a petefészkekben fejlődnek, ez esetben az anya szervezete táplálja is a fejlődő embriókat, mely tápanyagdús folyadék felvételével vagy sziktómlóplacenta (omphaloplacenta) segítségével valósulhat meg. A halak többsége azonban

külső megtermékenyítéssel szaporodik, mely során a nőtény egyed ikráit lerakja (ovipar) és a termékenyülés az anyahalak testén kívül zajlik (SZABÓ et al. 2000).

A termékenyülés során, a spermium csírapun (mikropylén) keresztül történő behatolása előtt még fontos szerkezeti és citokémiai változásokon megy keresztül. Ezt kapacitációnak nevezzük, mely során a sejtmembrán destabilizálódik a sikeres membránfúzió érdekében. Tokfélék esetében ekkor történik meg az akroszómareakció. Ennek szerepét a megtermékenyülésben eddig nem sikerült tisztázni, azt azonban igazolták, hogy az ivarsejtek egyesülését megelőző akroszómareakció előfeltétele a sikeres fúzió. E folyamat során a spermiumfej csúcsi plazmamembránja összeolvad az akroszómális membránnal és az akroszóma felnyílik, melyből enzimek szabadulnak ki. A kiszabaduló enzimek ikrahéjbontó szerepét ezidáig nem sikerült tisztázni. A tokfélék azonban számos mikropyle csatornával rendelkezik, melyeken keresztül a hímvarsejtek szabadon eljuthatnak a sejtmembránig. A fejlettebb csontoshalak petesejtjének felszínén található sugárirányú csöves rendszer (zona radiata), valamint az egyedüli mikropyle kialakulása tette lehetővé, hogy az akroszóma reakció feleslegessé váljon, és az evolúció során eltűnjön. A spermium behatolása a petesejtbe az impregnáció, ami után a folyamat tovább folytatódik. A citoplazmikus érés során az ikrában a lipidcseppek, valamint a szikszemcsék összeolvadnak, melynek következtében áttetszővé válik. Ugyanakkor a mikropylén keresztül agglutinin távozik az ikrából, amelytől a megtermékenyült ikrát körülvevő spermiumok összeragadnak, elveszítve ezzel termékenyítőképességüket, ami szintén a monospermiás termékenyítést szolgálja. A spermium behatolásának helyén mikrovillik találhatók, melyekhez a spermium kötődni tud. A termékenyült ikrában a beágyazódó spermium változást indukál: a citoplazma az animális pólus felé húzódik, ahol kialakul a termékenyülési domb, mely szintén a monospermiás termékenyülést szolgálja. A megkötődést követően a két ivarsejt sejthártyája összeolvad, membránfúzió jön létre (WALLACE 1978).

Az ikra, akárcsak a sperma, vízben aktiválódik. Ez egyrészt feltétele a sikeres megtermékenyülésnek, másrészt elindítja azokat a változásokat, melyek szükségesek az osztódó zigóta védelme érdekében. Itt nagy szerepet kap a kortikális reakció, mely során az animális póluson az alveolusok glikoprotein tartalma exocitózissal a sejthártya és a zona radiata közé kerül. Ennek következtében a zona radiata megkeményedik és ellenálló ikrahéj alakul ki, mely védi az embriót. Ugyanakkor az exocitózis következtében kialakuló ozmotikus nyomásváltozás miatt a sejthártya és a zona radiata közé víz áramlik ozmózissal. A kortikális reakció során kiszabaduló poliszacharid jellegű hidrophil kolloidok felületükön megkötik a beáramló vizet. A belső hidrosztatikus nyomás megnő, mely miatt a zona radiata eltávolodik a petesejt felszínétől, melynek következtében kialakul a szik körüli, perivitellinális tér, melyet szik körüli folyadék tölt ki. Itt osztódik majd tovább a megtermékenyült zigóta (WALLACE és SELMAN 1981).

A spermium megkötődése után néhány perccel a fej és a közepdarab beágyazódik a citoplazmába, a termékenyülési domb visszafejlődik, a kortikális reakció az ikra egész felszínén szétterjed, az ikra megduzzad. Az animális póluson kialakul a csírákorong, felszívódik a spermium sejtmaghártyája, a tömör kromatin-állomány fellazul, valamint kialakul a pronukleáris hártya. A második érési osztódás befejeződik, a második poláros test kilökődik. A két pronukleusz egyesülésével (kariogámia vagy konjugáció) helyreáll a genom diploid állapota. Ennek során kialakul a mitotikus orsó, a két centriólum az orsó két végére kerül, majd az első osztódási barázda megjelenésével elindul a mitotikus osztódások sorozata és az embriogenezis (SZABÓ et al. 2000) (8. ábra).



8. ábra: A zebradánió embriogenezise. A különböző fejlettségi állapotok neve alatt zárójelben a megtermékenyülés óta eltelt idő (28,5 °C-on) (KIMMEL et al. 1995).

Az embrionális fejlődés első szakasza a barázdálódás, mely során a zigóta osztódni kezd, és utódsejtek (blasztomérák) jönnek létre. Ezen blasztomérák száma az osztódások során mindig megduplázódik, így a tizedik osztódás után már több, mint ezer sejt jön létre, ezáltal kialakul a szedercsíra (morula) állapot. Ezt követően a blasztomérákból különböző sejtrétegek alakulnak ki az animális pólus felszínén, mely állapot a hólyagsíra (blastula). A csíralemezek kialakulása (gastrulatio) követi a folyamatot, mely során külső (ektoderma), középső (mezoderma) és belső (endoderma) csíralemezt különíthetünk el, kialakítva a bélesíra (gastrula) állapotot. Ezt követi a

csíralemezekből kialakuló szervek fejlődése (organogenesis) és szöveti differenciálódása (histogenesis). Az embriogenezis hossza fajonként eltérő, és akár csak a gametogenezis esetében, a víz hőmérséklete nagyban befolyásolja sebességét.

2.2.2.2 Termékenyítés

A termékenyítés eredményességének tekintetében megkülönböztethetünk kompenzálható és nem kompenzálható spermium-rendellenességeket. A kompenzálható rendellenességek azok, amelyeket a termékenyítés során magasabb sejtszám alkalmazásával kompenzálni lehet annak érdekében, hogy a várt termékenyülési mutatókat elérjük (pl. spermium morfológiai rendellenességei). A nem kompenzálható rendellenességek azok, melyek az utódok életképességét befolyásolják, és magasabb sejtszám alkalmazásával sem hoznak jobb termékenyülési eredményt (pl. kromatinállomány károsodása). A halspermiumokat pedig számos olyan hatás érheti, amely a DNS-állományukat károsítja. Ezek a károsodások a motilitási paraméterekben nem mindig nyilvánulnak meg, azonban a termékenyítés után komoly embrionális rendellenességeket és fejlődésbeli deformitásokat okozhatnak (EVENSON 1999, SAACKE 2008).

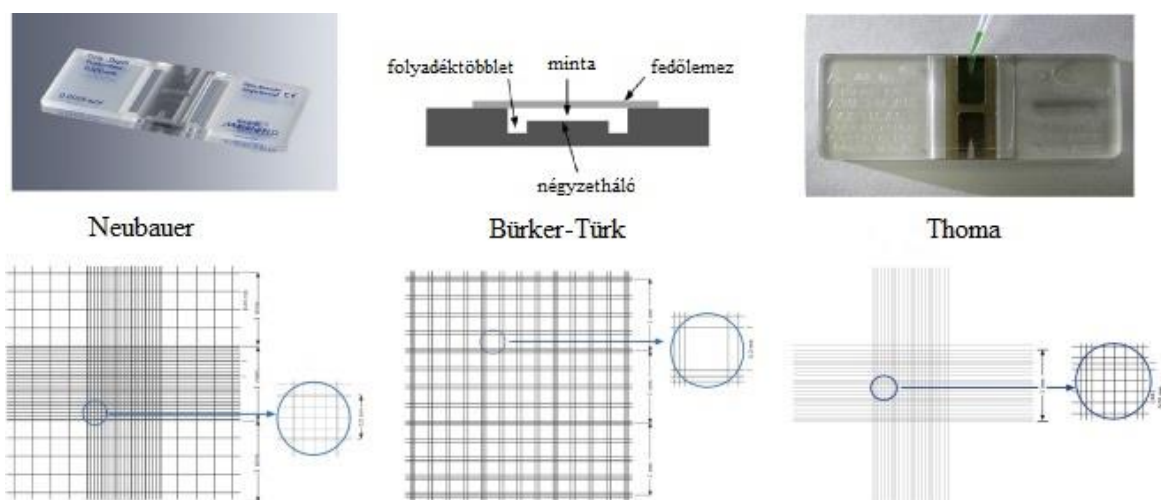
A halak ívási környezetének tényezőit két csoportba sorolhatjuk. Megkülönböztetünk alaptényezőket, melyek optimális szintje nélkül a szaporodás, illetve szaporítás létre sem jöhet (pl. hőmérséklet, oxigénszint, stressz hiánya). A végső szaporodási folyamatok beindulása azonban azokon a hormonális változásokon alapszik, amelyeket a kiváltó tényezők indukálnak (pl. légnyomásváltozás, ívási aljzat, vízszint emelkedése). Mesterséges szaporítás során a kiváltó tényezők biztosítása általában nehézségekbe ütközik, így hormonkezeléssel indukálható a folyamat. Ehhez használhatunk szintetikus GnRH-analógokat dopaminreceptor-antagonistákkal együtt (pl. Ovopel), valamint GtH-hormonok alkalmazása is gyakori (pl. hCG). Taxonómiaiailag közeli fajtól származó hipofízis beinjektálásával is a GtH-k megfelelő szintjét biztosíthatjuk. Ezenkívül szteroidok és prosztaglandinok alkalmazása is elterjedt (pl. $17\alpha,20\beta$ -DP; BROMAGE 1992, SZABÓ et al. 2000). Kistesű halak esetében azonban (pl. zebraadánió), ahol a hormonkezelés nem kivitelezhető, a környezeti tényezők (vízhőmérséklet, ionkoncentráció) változtatásával és a másik nem jelenlétével indukálható a folyamat: szaporítóedényekbe kihelyezve, ivar szerint elválasztva biztosíthatóak azok a feromonális ingerek, melyek segítségével beindítható a spermáció és az ovuláció folyamata.

A termékenyítés során fontos odafigyelni azokra az élettani sajátosságokra, melyek a termékenyülés sikerét befolyásolhatják. A halspermát, természetéből kifolyólag általában fajspecifikus hígítóban tárolják termékenyítés előtt. A termékenyítés módja lehet száraz vagy nedves, attól függően, hogy az ivarterméket szárazon keverjük össze, vagy vízben. Ez utóbbinál figyelembe kell venni, hogy a víz a spermát és az ikrát is aktiválja, így mindkettő csak rövid ideig

képes termékenyíteni, illetve termékenyülni. A spermium: ikra arány is meghatározó tényezője a sikeres termékenyítésnek, melynek megfelelő szintje szintén fajonként eltérő. Ponty esetében Linhart et al. (2004) 8000 spermium/ ikra arány alkalmazásával szignifikánsan alacsonyabb termékenyülést ért el, mint 8000-24 000 spermium/ ikra alkalmazásával. Ez utóbbi ráta elégséges volt a sikeres termékenyüléshez, azonban a legjobb eredményt 240 000 spermium/ ikra aránnyal érték el. Marcel (1981) azonban 13 000 spermium/ ikra aránnyal érte el pontyban a legjobb termékenyülést. Zebradánió fajban nincs irodalmi adat a megfelelő spermium: ikra arányról. Tengeri sün esetében 2500 spermium/ ikra arányt alkalmaznak a toxikológiai célú termékenyítési kísérletek során (EPA 2009, lsd. 2.3.3.2. fejezet).

2.2.3 A halsperma koncentrációjának vizsgálata

A halsperma koncentrációja a minőség fontos mutatója, mely kihatással lehet a termékenyítőképességre is, ezért ezen paraméter detektálása elengedhetetlen a halsperma vizsgálata során. Ehhez számos módszer áll rendelkezésünkre. Különböző hemocitóméterek, azaz sejtszámláló kamrák léteznek (Neubauer, Bürker-Türk, Thoma stb.), melyek tulajdonképpen vastag tárgylemezek, a felszínükön négyzethálós mintával (9. ábra). A vizsgálandó mintát a kamrába juttatva, majd arról mikroszkópos felvételt készítve, utólag leszámolhatóak a négyzethálós térben található sejtek. A számolás történhet manuálisan, vagy különböző szoftverek (pl. ImageJ) segítségével. A négyzethálós tér térfogatát ismerve pedig kiszámolható a sperma koncentrációja (BRITO et al. 2016).



9. ábra: Neubauer, Bürker-Türk, valamint Thoma típusú hemocitóméterek, valamint azok jellemző mintázata (BRITO et al. 2016 nyomán).

Ennél modernebb eljárásnak számít a CASA-rendszer, valamint az ahhoz használt különböző típusú kamrák alkalmazása. Ezt eredendően a sperma motilitásának vizsgálatára fejlesztették ki, ebből adódóan a koncentráció számításához a kapilláris elven működő

tárgylemezek használata nem túl megbízható eljárás. Ennek oka, hogy ezen kamrák rétegvastagsága sokkal kisebb ($20\ \mu\text{m}$), mint a kimondottan e célból készült sejtszámláló kamráké ($100\ \mu\text{m}$), így ezekben a folyadékok áramlása lassabb, így a hímivarsejtek koncentrálnak bizonyos távolságra a kamra falától (Segré-Silberberg hatás). A nem egyenletes sejteloszlás miatt pedig félrevezető eredményeket kaphatunk (KUSTER 2005).

A spektrofotométer alkalmazása számít a legelterjedtebb eljárásnak az állati sperma koncentrációjának meghatározására. Működésének alapja, hogy a vizsgálandó mintát adott intenzitású fényel besugározva a fény a mintában elnyelődik, áthalad rajta, vagy visszaverődik. Az áthaladó fény mennyisége alapján lehet következtetni a sperma koncentrációjára. Az áramlási citométer (flow-cytometer) alkalmazása is elterjedt, működése a spektrofotométeréhez hasonló: a sejteket fluoreszcens próbával jelölik, melyek a besugárzott fény hatására optikai jelet küldenek a detektorhoz, ami ez alapján meghatározza a minta koncentrációját. Ugyanezen az elven működik a NucleoCounter nevű berendezés, melyet kimondottan a sperma koncentrációjának megállapítására fejlesztettek ki (BRITO et al. 2016).

2.3 Toxikológiai tesztrendszer

Napjainkban számos toxikológiai tesztrendszer létezik, melyeket a különböző szennyezőanyagok káros hatásának kimutatására fejlesztettek ki. Ezek nagy része sztenderdizált, azaz a kísérletek körülményei minden részletre kiterjedően kidolgozottak. Az Egyesült Államokban az EPA (Environmental Protection Agency), Európában pedig az OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) végzi a különböző vizsgálati protokollok szabványosítását. Az ISO (International Organization for Standardization) pedig az egyik legnagyobb szabványügyi szervezet, mely több, mint száz ország tagszervezeteit foglalja magában. Magyarországon az ISO-szabványok honosítását a Magyar Szabványügyi Testület végzi.

A halak közkedvelt toxikológiai modellszervezetek, mivel ez az egyetlen olyan gerinces csoport, mely teljes életciklusát a vízben tölti, ezáltal teljes testfelületükkel érintkeznek a környezetben előforduló vegyi anyagokkal. Mindemellett taxonómiailag az emlősöknél alacsonyabb rendűek, így toxikológiai célú felhasználásuk a 3R-stratégiába is jól beilleszthető. Emiatt számos toxikológiai szabvány létezik, melyet különböző halfajok toxikológiai célú vizsgálatára fejlesztettek ki (3. táblázat). A toxikológia tesztrendszerekkel szemben támasztott követelmények a következők: reprodukálhatóság, érzékenység, megbízhatóság és környezeti realizmus (GRUIZ et al. 2001).

3. táblázat: A jelenleg érvényes, halakra kidolgozott toxikológiai vizsgálati protokollok

Szabvány száma	Szabvány neve	Szabvány neve magyarul	Vizsgálat végpontja	Vizsgálat időtartama	Vizsgálathoz javasolt halfajok
OECD 236	Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test	Halembrió akut toxicitási vizsgálata	24 óránkénti LC ₅₀ -értékek, koagulált embriók aránya, szívverés hiánya, szomiták kialakulásának hiánya, farok leválásának hiánya	96 óra	zd
OECD 210	Fish, Early-life Stage Toxicity Test	Halak korai életszakaszának toxicitási vizsgálata	Embrionális fejlődés, kelés, túlélés, abnormális megjelenés és viselkedés, testtömeg, testhossz	táplálkozó életkor eléréséig	zd, md, tcs, szp, tf, Men. sp.
OECD 229	Fish Short Term Reproduction Test	Halak rövid idejű reprodukciós vizsgálata	Túlélés, viselkedés, megjelenés, termékenyülés, másodlagos nemi jelek, vitellogenin-szint, ivarszervek hisztopatológiai vizsgálata	21 nap	zd, md, tcs
OECD 234	Fish Sexual Development Test	Halak szexuális fejlődésének vizsgálata	Vitellogenin-szint, ivararány	termékenyüléstől teljes ivarérettségig	zd, md, hp
OECD 230	21-day Fish Assay	21 napos halteszt	Vitellogenin- és aromatáz-szint, másodlagos nemi jelek	21 nap	zd, md, tcs
OECD 215	Fish, Juvenile Growth Test	Hallárvák növekedésvizsgálata	Testtömeg, abnormális megjelenés és viselkedés, növekedési ráta	minimum 28 nap	zd, md, szp
OECD 212	Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages	Halembriók és nem táplálkozó lárvák rövid idejű toxicitási vizsgálata	Embrionális fejlődés, kelés, túlélés, abnormális megjelenés és viselkedés, testtömeg, testhossz	termékenyüléstől a szik felszívódásáig	zd, md, tcs, szp, po
OECD 203	Fish, Acute Toxicity Test	Halak akut toxicitási vizsgálata	24 óránkénti LC ₅₀ -értékek	96 óra	zd, md, tcs, szp, po, szg, kn
OECD 305	Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure	Bioakkumuláció halakban: víz és táplálék útján történő kitettség	Bioakkumulációs faktor (BCF)	28 nap	zd, md, tcs, szp, po, szg, kn, hp
OECD 240	Medaka Extended One Generation Reproduction Test	Medaka meghosszabbított egy generációs reprodukciós vizsgálata	F0: termékenység és termékenyülés, F1: kelés (aránya és ideje), túlélés, növekedés, termékenység, termékenyülés, vitellogenin-szint, másodlagos nemi jelek, ivararány, az első szaporodás ideje, hisztopatológiai elváltozások (ivarszervek, máj, vese), F2: kelés (aránya és ideje)	19 hét	md, zd
MSZ 22902-3:1990	Víztoxikológiai vizsgálatok. Statikus halteszt.		24 óránkénti LC ₅₀ -értékek	96 óra	zd
MSZ 21978-3:1986	Veszélyes hulladékok vizsgálata. Halteszt.		LC ₅₀ -érték	48 óra	szg
MSZ EN ISO 7346-1:2000	Vízminőség. Az édesvízi halakra veszélyes anyagok halálos mérgező hatásának meghatározása [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] felhasználásával. 1. rész: Statikus módszer		24 óránkénti LC ₅₀ -értékek	96 óra	zd
MSZ EN ISO 7346-2:2000	Vízminőség. Az édesvízi halakra veszélyes anyagok halálos mérgező hatásának meghatározása [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] felhasználásával. 2. rész: Félstatikus módszer		24 óránkénti LC ₅₀ -értékek	96 óra	zd
MSZ EN ISO 7346-3:2000	Vízminőség. Az édesvízi halakra veszélyes anyagok halálos mérgező hatásának meghatározása [Brachydanio rerio Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] felhasználásával. 3. rész: Átfolyásos módszer		24 óránkénti LC ₅₀ -értékek	96 óra	zd

Rövidítések: zd=zebradánio, md=medaka, tcs=tűzcsele, szp=szivárványos pisztráng, tf=tarka fogasponty, Men. sp.= Menidia-fajok, hp=háromtüskés pikó, po=ponty, szg=szivárványos guppi, kn=kék naphal.

A toxikológiai modellszervezeteknek pedig az alábbi kritériumoknak kell megfelelniük:

- könnyű beszerezhetőség,
- laboratóriumban könnyen, nagy mennyiségben tenyészthető,
- genetikai háttere és tenyésztési előélete ismert,
- aránylag érzékeny különböző toxikus anyagokra,
- reprezentatív egy nagyobb taxonómiai csoportra (HILL et al. 2005).

A zebradánió és a ponty rendelkezik ezekkel a tulajdonságokkal, ennek köszönhetően mindkét faj szerepel a fentebb említett toxikológiai vizsgálati protokollok nagy részében a kísérletekhez javasolt halfajként. A fentiekén túlmenően mindkét faj rendelkezik olyan pozitív tulajdonságokkal, melyek lehetővé teszik felhasználásukat nemcsak toxikológiai, hanem szaporodásbiológiai kísérletekhez is (MOTTET és LANDOLT 1987).

2.3.1 A zebradánió és ponty mint modellszervezetek

A zebradánió és a ponty a pontyfélék családjába tartozó, édesvízi halfajok. A zebradániót számos kutatási területen használják modellszervezetként (pl. fejlődésbiológia, élettan, gyógyszerhatásvizsgálatok, biotechnológia), valamint a ponty kísérleti modellként való alkalmazása is egyre elterjedtebb, ennek köszönhetően egyre több laboratórium, recirkulációs és intenzív rendszer épül e fajok tartására. Kísérleti modellállatkénti felhasználásuk előnyei az alábbiakban foglalható össze:

- alacsony ellátási és fenntartási költségek,
- békés természet,
- kevésbé érzékeny a víz és táplálék minőségére,
- beltenyésztésre kevésbé érzékeny,
- kiváló reprodukciós képesség (zebradánió esetében több száz, ponty esetében több százezer ikra /egyed),
- az anya testén kívüli (*ex utero*) embriófejlődés,
- átlátszó ikrahéj és áttetsző embrió,
- jól kifejezett ivari dimorfizmus,
- gyors fejlődés (48-72 órán belül kelés).

Ezen közös tulajdonságokon túlmenően a zebradánió még az alábbi pozitívumokkal is jellemezhető (10. ábra):

- minimális állatonkénti helyigény,
- rövid generációs idő (2-3 hónap az ivarérett kor eléréséig),

- egész év során szaporodóképes (HORN és ZSILINSZKY 1993, LELE és KRONE 1996).



10. ábra: A zebradánió (Fotó: Halgazdálkodási Tanszék).

A ponty a fentebb felsorolt közös jellemzőkön kívül a következő előnyökkel rendelkezik (11. ábra):

- nagyobb testméretéből kifolyólag könnyebb kezelhetőség,
- állandó környezeti paraméterek (22-24 °C-os vízhőmérséklet, folyamatos takarmányozás) között tartva, hormonális stimulus hatására egész évben szaporítható,
- nagy mennyiségű ivarterméket termel (akár 50 mL sperma/egyed).



11. ábra: A ponty.

2.3.2 Az *in vitro* tesztrendszerek

Napjainkban a 3R-stratégia elterjedésének köszönhetően széleskörűen használják az *in vitro* tesztrendszereket a toxikológia, valamint az ökotoxikológia területén is. Legáltalánosabb a sejt- és szövettenyészetek használata, melyeket *in vitro* körülmények között tartanak fenn úgy, hogy eredeti struktúrájukat és funkciójukat megőrizték, ezáltal élő szenzorként képesek jelezni a szennyezőanyagok toxikus hatását. Előnyük az *in vivo* tesztrendszerekkel szemben, hogy gyorsan kivitelezhetőek, automatizálható méréseket tesznek lehetővé, melyek pontos eredményt adnak, valamint a kontrollált körülményeknek köszönhetően jól reprodukálhatóak, ezáltal kevesebb idő-, költség- és munkaerő-ráfordítással járnak, valamint könnyen sztenderdizálhatóak. Mindazonáltal

kisebb térfogatban elvégezhetőek, mely által kevesebb veszélyes hulladék keletkezik, ami szintén jobban illeszkedik a 3R-stratégiába. Hátrányuk, hogy a szervezetben végbemenő metabolikus folyamatokat nem modellezik, ezáltal eredményeik csak kellő körültekintéssel extrapolálhatóak (HODGSON et al. 2004).

2.3.3 A sperma toxikológiai célú vizsgálata

A fentebb felsorolt előnyök miatt a sperma toxikológiai célú felhasználása elterjedőben van az utóbbi években. A sperma számos olyan mérhető paraméterrel rendelkezik (pl. antioxidáns válasz, mitokondriális aktivitás, mozgási paraméterek), melyek dózis-hatás, valamint idő-hatás összefüggéssel képesek reagálni a szennyezőanyagok káros hatására (Izd. 2.2 fejezet). Az általánosan, *in vitro* tesztekhez használt sejt- és szövettenyészetekkel szemben azonban rendelkezik néhány előnyös tulajdonsággal. A legtöbb emlős haszonállat és külső megtermékenyítéssel szaporodó faj esetében a sperma bármikor, frissen kinyerhető a donor egyedből, ezáltal nem szükséges a költség- és munkaerőigényes hosszútávú tárolása. A sperma kinyerése ráadásul nem invazív módon történik, mely állatvédelmi szempontból is előnyösebb. További pozitívum, hogy az érett spermiumokban nincs DNS-szintézis, amely a keletkezett károsodásokat kijavíthatná, így a toxikus anyagok hatása közvetlenül vizsgálható. Ennek köszönhetően számos publikáció született, mely a sperma toxikológiai modellként történő felhasználásáról számol be.

2.3.3.1 Emlős spermán végzett toxikológiai vizsgálatok

Laboratóriumi emlősök (patkány, egér) esetében nincs túl sok publikáció e területen, mivel esetükben a sperma kinyerése - kis testméretükből adódóan - nehézségekbe ütközik. Emiatt leggyakrabban spermatogóniumokból álló sejtenyészetet, valamint here szövettenyészetet használnak fel toxikológiai céllal (HABAS et al. 2014, 2016, CHAPIN et al. 2016, JEON et al. 2017). Ezekon különböző anyagok DNS-károsító hatását vizsgálják MTT assay, COMET assay, illetve TUNEL assay segítségével. Patkány esetében azonban végeztek olyan kísérletek is, melyben közvetlenül a spermiumokon bekövetkező károsodásokat vizsgálták a sperma toxikus anyagoknak való *in vitro* kitettsége esetén (ABDALLAH et al. 2009). A módszer hátránya, hogy a sperma kinyerése a donor egyedek feláldozásával jár. Nyúl fajban a spermavétel könnyen kivitelezhető műhüvely segítségével, így toxikológiai célú *in vitro* használata nem ütközik állatvédelmi előírásokba (YOUSEF et al. 2007). Létezik azonban e faj esetében olyan publikáció is, amely arról számol be, hogy a spermával az *in vitro* kitettségét követően termékenyítettek, és a termékenyülési százalék megállapításához a zigótákat, illetve a 2-4 sejtes embriókat kimosták az anyákból (FOOTE 1999).

Gazdasági haszonállataink (szarvasmarha, juh, sertés) esetében a sperma kinyerése könnyen kivitelezhető, így gyakrabban szokták felhasználni toxikológiai kísérletek során. A kan-, kos- és bikaspermát mitokondriális zavarok vizsgálatához használják széleskörben különböző toxikus anyagoknak való kitettség során (CASTELLANOS et al. 2013, 2016, AJAO et al. 2015, VICENTE-CARRILLO et al. 2015, YURDAKOK et al. 2015, FERNANDES SILVA et al. 2016). Ezenkívül kanspermát használnak elterjedten a *Bacillus cereus* által termelt toxinok (cereulid, valinomicin) kimutatására, mely baktérium komoly ételmérgezéseket és egészségügyi problémákat okozhat (ANDERSSON et al. 1997, 1998, 2004, 2010, HOORNSTA et al. 2003). Ezen toxinok *in vivo* felborítják a homeosztázist, károsítják a sejtmembránt, ezáltal K⁺-efflux megy végbe a sejtekben, mely mitokondriális diszfunkcionalitást, valamint hipoglikémiát okoz. Emellett a vér pH-értékét is csökkentik, valamint súlyos májkárosodást is okozhatnak, melyek mind letálisak lehetnek. Kimutatásuk alapja, hogy a sperma *in vitro*-kitettség esetén dózis-hatás, valamint idő-hatás összefüggésekkel reagál a mitokondriotoxikus hatásra, melynek következtében a sperma motilitása nagymértékben csökken, valamint elektronmikroszkópos felvételeken megfigyelhető a mitokondriumok megduzzadása is. Fluoreszcens festékek segítségével (pl. JC-1) pedig a mitokondriumokban bekövetkező membránpotenciál-változás is kimutatható. Ezen teszrendszer ételmintákból, árvíz sújtotta épületek szigeteléséből, valamint elektrosztatikus szűrést követően a levegőből is képes kimutatni a toxinok jelenlétét. A kansperma toxikológiai célú felhasználása sztenderdizált: a kanspermium biotesztet 2014-ben akkreditálta a Finn Akkreditációs Szolgálat illetve a Nemzetközi Laboratórium Akkreditáló Együttműködés (ILAC) (SALIN et al. 2017).

2.3.3.2 Tengeri sün fajban végzett sperma- és embriotoxicitási vizsgálatok

A tengerisүн-sperma *in vitro* toxikológiai célú felhasználásának alapja, hogy akárcsak a halak többsége, ez az élőlénycsoport is külső megtermékenyítéssel szaporodik, ezáltal a vízben szabadabbá váló gaméták közvetlen kontaktusba kerülnek a vízben jelenlévő szennyezőanyagokkal, mely kihathat a szaporodás sikerére. Ennek köszönhetően, az emlős spermához hasonlóan, a tengeri sün spermáját is széleskörűen használják xenobiotikumok toxikus hatásának kimutatására (DINNEL et al. 1987, 1989, VOLPI GHIRARDINI és ARIZZI NOVELLI 2001, VOLPI GHIRARDINI et al. 2001, LERA et al. 2006). Ez az eljárás is minden részletében sztenderdizált, melyről az EPA adott ki 2009-ben szabványt.

A szabvány részletesen kitér a kísérletekhez felhasznált fajra (*Arbacia punctulata*), az egyedek tartására, az ivartermék kinyerésének módjára, a kísérlet végrehajtására, valamint az eredmények statisztikai kiértékelésére is. A módszer lényege, hogy 4 egyedtől keverve gyűjtenek össze spermát, majd a mintát kiteszik a tesztelendő toxikus anyag különböző koncentrációinak,

egy óra időtartamra (12. ábra). Az expozíciós idő elteltével a spermával 4 egyedtől származó, kevert ikratételeket termékenyítenek, meghatározott spermium: ikra arányt alkalmazva (2500:1). Húsz perc eltelte után az ikratételeket formalinban fixálják, majd mikroszkóp segítségével meghatározzák a termékenyülési százalékot, melyet a termékenyülési membrán megléte jelez. A teszt érvényességi kritériuma, hogy a kontroll csoportban a termékenyülésnek el kell érnie a 70%-ot. A fejlődő embriókban kialakuló deformitások (vázrendszer és emésztőrendszer elváltozásai) és az embriogenezis különböző állapotainak kései kialakulása mind képesek jelezni a toxikus hatásokat, azonban ezek megállapítása szubjektív, így nem szerepel a szabványban. Ennek ellenére, mivel érzékenyebb paraméternek bizonyul, mint a termékenyülés, számos kísérletben vizsgálták (PAGANO et al. 1978, ARIZZI NOVELLI et al. 2002, LOSSO et al. 2004, MANZO et al. 2006, LOSSO et al. 2007, HWANG et al. 2014).

A sztenderdizálás ellenére azonban számos vizsgálatban nem a szabványban előírt fajt használják, hanem leginkább *Paracentrodus lividus*-t, ami miatt az előírt spermium: ikra arányt is módosítják a kísérletekben (ARIZZI NOVELLI et al. 2003, LOSSO et al. 2004, LERA et al. 2006), ami megkérdőjelezi a kapott eredmények összehasonlíthatóságát.



12. ábra: Spermagyűjtés a tengeri süntől (Fotó: www.fpir.noaa.gov).

A szabvány hátránya, hogy ezen tesztrendszer nem adaptálható édesvízi körülményekre, mivel a tengeri sün tengervízben él és szaporodik. Ezenkívül a termékenyülést a sperma minőségén kívül számos tényező befolyásolja (pl. az ikra minősége), így a termékenyülési százalék kísérleti végpontként történő alkalmazása nem teszi lehetővé a spermára kifejtett direkt hatás vizsgálatát. Ezen túlmenően a termékenyítés során az ikra is érintkezik a toxikus anyagokkal, amiben a spermát inkubálták, így a termékenyülési eredményekben nem feltétlenül csak a sperma, hanem az ikra kitettsége is manifesztálódik, mely torzíthatja az eredményeket. Ez utóbbi hátrányok miatt az utóbbi években elterjedt a tengerisün-sperma motilitásának vizsgálata (MOT-teszt) a termékenyülési százalék helyett a toxikológiai tesztekben (MANZO et al. 2006, FABBROCINI et

al. 2010, 2017, D'ADAMO et al. 2014, MURADO és PRIETO 2014, GAMBARDELLA et al. 2015). Hátránya viszont, hogy ez a módszer nem sztenderdizált jelenleg.

2.3.3.3 A halsperma toxikológiai célú felhasználása

A halspermim toxikológiai célú felhasználásával kapcsolatban számos publikáció látott napvilágot eddig. Ezen vizsgálatok azonban nem egységes módszertan szerint kerültek elvégzésre, emiatt számos különbség mutatkozik köztük. Ezekben eltér többek között a vizsgálatokhoz használt donor egyedek faja (pl. afrikai harcsa, tokfélék, ponty, sügérfélék (Percidae)), a sperma kitettség előtti kezelése (pl. szeminális plazma eltávolítása, különböző hígítók használata), a vizsgálati végpontok (pl. motilitási paraméterek, antioxidáns enzimek aktivitása, termékenyülési százalék) és a toxikus anyagnak való kitettség időtartama (0 és 48 óra között) is. Léteznek továbbá olyan publikációk is, melyek arról számolnak be, hogy mélyhűtött spermán végeztek el a toxikus anyagok tesztelését (FABBROCINI et al. 2012, 2016). A módszer hátránya, hogy maga a mélyhűtés is képes károsítani a spermiumokat (jégkristályképződés, hidegsokk, felolvasztás közbeni hőszokk, toxikus védőanyagok stb.), mely csökkent életképességet, felolvasztás utáni motilitást, mozgási időtartamot, valamint megváltozott DNS-integritást eredményezhet (YANG et al. 2007, CABRITA et al. 2010, BERNÁTH et al. 2014, 2016), így nem csupán a toxikus anyagok hatása manifesztálódhat az eredményeken. További probléma, hogy a felolvasztott minták minősége olyannyira diverz lehet, ami megkérdőjelezi a toxikológiai tesztrendszerként történő alkalmazásukat. Mindamellet a spermamélyhűtés idő-, munkaerő- és gyakorlatigényes folyamat, mely ellentétes a toxikológiai vizsgálatok követelményeivel, ahol a gyorsaság és egyszerűség fontos szempontok.

További probléma, hogy számos publikáció esetében a vizsgált paraméterek nincsenek pontosan definiálva, így nem lehet tudni, hogy konkrétan mely értékeket mérték a toxikus kitettség hatására (pl. a sebesség esetében 3 mérhető paraméter is rendelkezésre áll: VAP, VCL és VSL). Azon kísérletekben, ahol a vizsgálati körülmények többé-kevésbé meg is egyeznek, mégis ellentmondásos eredmények születtek (pl. HAYATI et al. 2017 és DIETRICH et al. 2011 vizsgálatai). Továbbá azzal kapcsolatban sincs konszenzus, hogy a sperma mely paramétere képes legjobban jelezni a toxikus anyagoknak történő *in vitro* kitettségét. Ebből is látható, hogy a kapott eredmények összehasonlíthatóságához szükséges egy sztenderd vizsgálati módszertan leírása, mely minden részletében kidolgozott (HATEF et al. 2013). A következőkben a disszertációban is vizsgált nehézfémek halspermára gyakorolt hatásának vizsgálatáról beszámoló publikációk kerülnek áttekintésre és összehasonlításra.

Zebradánió esetében csak a Cd²⁺ spermára kifejtett hatásáról áll rendelkezésünkre irodalmi adat. Eszerint már 0,5 µg/L-es koncentráció szignifikánsan csökkentette a sperma motilitási

paramétereit (PMOT, VCL, VSL, VAP, a mozgás időtartama) 10 perces expozíció esetén. Ennél kevésbé érzékeny paraméterek a DNS-fragmentáció mértéke és a membránintegritás, melyeknél csak 5 µg/L okozott szignifikáns különbséget a kontrollhoz viszonyítva. A membrán fluiditására, a ROS-szintre és a mitokondriális funkciókra nem hatott még a legnagyobb, 10 µg/L-es koncentráció sem (ACOSTA et al. 2016).

Ponty esetében csak 100 mg/L Cd²⁺-koncentráció mellett csökkent szignifikánsan a motilitás és az életképesség az expozíciót követő azonnali vizsgálat esetén, míg a mozgás időtartama már 50 mg/L Cd²⁺-kitettséget követően csökkent (HAYATI et al. 2011). Egy másik kísérletben a 2 órás expozíció után szignifikánsan csökkentek a sperma sebességi paramétere (VAP, VCL, VSL) 10 mg/L-es koncentráció vizsgálata során, azonban a mozgás időtartamára csak 50 mg/L Cd²⁺ volt hatással (CHYB et al. 2001a). Egy másik kísérletben azonban magasabb expozíciós idő mellett (24 és 48 óra) csak 50 mg/L Cd²⁺-koncentráció okozta a motilitás, a VCL és VSL szignifikáns csökkenését, a 10 mg/L-es koncentrációnak még nem volt hatása (DIETRICH et al. 2011).

A Hg²⁺-kitettség hatását vizsgálva megállapították, hogy 2 órás expozíció után szignifikánsan csökken a pontysperma sebessége (VAP, VCL, VSL) már 0,05 mg/L-es koncentráció esetében, 0,2 mg/L pedig a mozgás időtartamát is csökkenti (CHYB et al. 2001b). A Zn²⁺ vizsgálata során azonban megfigyelhető a sebességi paraméterek között különbség: míg a VSL már 10 mg/L koncentráció felett szignifikánsan csökken, addig a VAP 50 mg/L-es koncentráció mellett, a VCL pedig csak 100 mg/L hatására. A mozgás időtartamának szignifikáns csökkenése is csak 100 mg/L Zn²⁺-koncentráció hatására következett be (CHYB et al. 2000). A Cu²⁺ pontyspermára *in vitro* kifejtett toxikus hatásáról csak egy publikáció számol be, melyben 4 és 24 órás kitettséget követően vizsgálták a sperma tejsav-dehidrogenáz-, β-N-acetilglükózaminidáz-, valamint foszfátázsav-aktivitását (SAROSIEK et al. 2009). Az eredmények szerint az első két enzim aktivitására nincs szignifikáns hatással a Cu²⁺ még 100 mg/L-es koncentrációban sem, és a foszfátázsav-aktivitás is csak 24 órás kitettséget követően, és csak 100 mg/L-es koncentrációt alkalmazva csökken. Ugyanezen vizsgálatban már 10 mg/L Zn²⁺ és Cd²⁺ is szignifikánsan csökkentette e vizsgált paramétert. E fentebb említett négy nehézfém hatását ezenkívül még számos halfaj spermáján vizsgálták, számos motilitási és antioxidáns paramétert mérve.

Az As³⁺, Cr³⁺ és a Ni²⁺ pontyspermára kifejtett toxikus hatásáról nincs irodalmi adat. Az As³⁺ hatását eddig más halfaj esetében sem vizsgálták, a Cr³⁺ hatását azonban kecsge (*Acipenser ruthenus*) spermán tesztelték: 2 órás expozíció szignifikánsan csökkenti a spermiumok mozgási sebességét 5 mg/L-es kitettség esetén, azonban a motilitásra nincs hatással. Ugyanezen koncentráció növeli a fehérje oxidáció, valamint a glutation-reduktáz és glutation-peroxidáz

aktivitását, azonban a lipidperoxidáció és a szuperoxid-dizmutáz szintjét nem. Ugyanebben a kísérletben már 0,05 mg/L Cd^{2+} szignifikánsan csökkentette a sebességet, a motilitást azonban nem, mint ahogy a fentebb említett antioxidáns paraméterek egyikét sem (LI et al. 2010a). A Ni^{2+} halsperma motilitási paramétereire kifejtett hatásával is csak egy publikáció foglalkozott ezidáig, melyben a kísérletek során azonnali kitettséget követően vizsgálták a motilitást és a sebességet 4 halfaj, a sebes pisztráng, fejes domolykó (*Leuciscus cephalus*), menyhal (*Lota lota*) és afrikai harcsa spermáján (LAHNSTEINER et al. 2004). Az eredmények szerint egyik halfaj spermáján sem jelent meg a kontrollhoz viszonyított szignifikáns különbség még az alkalmazott legnagyobb, 125 mg/L-es koncentráció esetében sem.

A nehézfémekkel kezelt spermával történő termékenyítés hatását eddig csak négy halfaj esetében vizsgálták. Ponty fajban csak a Cd^{2+} termékenyülésre kifejtett hatásáról van irodalmi adat, mely szerint a sperma toxikus anyaggal történő hígítását követően azonnal termékenyítve csak 100 mg/L okozta a termékenyülés szignifikáns csökkenését (HAYATI et al. 2017).

Szivárványos pisztrángban a Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Hg^{2+} és Cd^{2+} hatását is vizsgálták ezidáig. A termékenyülésre nem volt szignifikáns hatással a 1 mg/L-es Cu^{2+} és Ni^{2+} - kitettség 5 perces expozíció esetében, azonban a kelés szignifikánsan csökkent a sperma 1 mg/L-es Cu^{2+} -kezelését követően (SHAWN & BROWN 1971). Billard és Roubaud (1985) azonban 40 perces expozíció után már 0,5 mg/L Cu^{2+} , 0,0005 mg/L Cr^{3+} és 1 mg/L-nél nagyobb Hg^{2+} -koncentráció esetében tapasztalták a termékenyülés csökkenését. Azonos koncentrációk közvetlenül a spermára gyakorolt toxicitását vizsgálva megállapították, hogy a Hg^{2+} esetében sokkal alacsonyabb koncentrációk mellett jelentkezik a sperma minőségének csökkenése, mint a termékenyülés arányának csökkenése. Ezzel szemben a Cr^{3+} vizsgálata során magasabb, a Zn^{2+} esetében pedig azonos koncentráció mellett volt megfigyelhető a motilitás csökkenése. A Cu^{2+} esetében azonban a spermára közvetlen kifejtett toxicitás nem jelentkezik, bár az nem került tisztázásra, hogy a sperma mely paramétere szolgált vizsgálati végpontként. Dietrich et al. (2010) pedig azt figyelte meg, hogy 4 órás expozíció után a Hg^{2+} és Cd^{2+} csak 10 mg/L koncentráció esetében okozta a kelési százalék szignifikáns csökkenését, mint ahogy a motilitás értékének is. A VCL értéke azonban csak 100 mg/L koncentráció mellett csökkent szignifikánsan mindkét nehézfém-kezelés hatására, valamint Cd^{2+} vizsgálata során a LIN értéke is, míg a Hg^{2+} -kitettség már 1 mg/L esetén szignifikánsan hatott a LIN-re. A kalászhalakúak rendjébe tartozó *Atherinops affinis*-ban azonban a Cu^{2+} már az 56 $\mu\text{g/L}$ -es koncentrációtól szignifikáns hatással volt a termékenyülésre a sperma 15 perces expozíciója esetén, a Cu^{2+} termékenyülésre számított EC_{50} -értéke pedig 109 $\mu\text{g/L}$ volt (ANDERSON et al. 1991). Afrikai harcsa fajban a Hg^{2+} -kezelést követően azonnal sor került a termékenyítésre, amire csak az alkalmazott legnagyobb, 1 mg/L-es koncentráció volt

szignifikáns hatással, ahogyan a kelésre is (RURANGWA et al. 1998). Az As^{3+} és Zn^{2+} termékenyülésre kifejtett hatásáról a halsperma *in vitro* expozíciója esetén nincs irodalmi adat.

2.4 A disszertációban vizsgált toxikus anyagok általános bemutatása

A nehézfémek azon kívül, hogy *in vitro* képesek csökkenteni a sperma motilitási paramétereit és termékenyítőképességét, számos károsodást képesek okozni az élő szervezetben is *in vivo* kitétség esetén. A pontos definíciót illetően azonban a mai napig nincs konszenzus azzal kapcsolatban, hogy pontosan mely elemeket soroljuk a nehézfémek közé. Általánosságban elmondható, hogy a nehézfémek azok a nagy sűrűségű, atomtömegű, valamint atomszámú elemek, melyek toxikus hatással rendelkeznek. A legelterjedtebb meghatározás szerint az 5 g/cm^3 -nél nagyobb sűrűségű elemek tartoznak ide (DUFFUS 2002). Ez alapján az arzén viszont nem tekinthető nehézfémnek, a toxikussága miatt mégis a nehézfémek között szokták említeni. Az Európai Bizottság 2000/532/EK határozatában a Sb, As, Cd, Cr(VI), Cu, Pb, Hg, Ni, Se, Te, Tl és Sn elemeket sorolja a nehézfémek közé, mely listában az arzén ugyan szerepel, a cink viszont nem, pedig ez utóbbi sűrűsége 5 g/cm^3 -nél nagyobb.

Egyes nehézfémek a normális életműködéshez kis koncentrációban nélkülözhetetlenek, azonban nagy mennyiségben súlyos mérgezést okozhatnak (pl. cink, réz, szelén, vas). Más nehézfémek viszont nem rendelkeznek élettani szereppel, és a szervezetbe jutva már kis koncentrációban is toxikus hatást fejtenek ki (pl. arzén, higany, kadmium, ólom). A nehézfémek közös jellemzője, hogy antropogén hatásra, főként ipari emisszió és mezőgazdasági tevékenység révén a környezetbe nagy mennyiségben kijutnak, biológiailag nem bomlanak le, ezáltal az élő szervezetben felhalmozódnak. A bioakkumulációnak köszönhetően előfordulhat, hogy koncentrációjuk a szövetekben és szervekben nagyságrendekkel nagyobb mértékű, mint amilyen mennyiségben az adott elem a környezetben előfordul (BADSHA és GOLDSPINK 1982, COPE et al. 1994, VAN DER OOST et al. 2003). Ebből kifolyólag a táplálékláncon keresztül is képesek felhalmozódni (biomagnifikáció) (LEHEL és LACZAY 2011).

A fémek elemi formában ritkán fordulnak elő, általában vegyületeket alkotnak, melynek oka ionjaik kémiai reaktivitása. Ez az alapja toxicitásuknak is, valamint az endogén fémionokhoz való hasonlóságuk, amely a normál sejtműködés zavarát idézheti elő.

A következőkben a disszertációban is vizsgált nehézfémek kerülnek bemutatásra. A zebradánió és ponty fajban mért 96 órás LC_{50} -értékeiket a 4. táblázat tartalmazza.

4. táblázat: Zebradánió és ponty fajban mért 96 órás LC₅₀-értékek különböző nehézfémek esetében.

	Zebradánió	Ponty
	(mg/L)	
Cr	54,57 (NISHA et al. 2016)	25,9 (WONG et al. 1982)
Zn	44,48 (WANG et al. 2013)	0,45-1,34 (ALAM & MAUGHAN 1992)
Cu	0,17 (WANG et al. 2013)	0,3 (ALAM & MAUGHAN 1992)
Cd	6,5 (WANG et al. 2013)	21,07 (SÖVÉNYI & SZAKOLCZAI 1993)
Ni	9,07-18,92 (ALSOP & WOOD 2011)	1,3-1,54 (ALAM & MAUGHAN 1992)
Hg	0,14 (WANG et al. 2013)	0,16-0,71 (ALAM & MAUGHAN 1992)
As	6,75 (BHAVANI & KARUPPASAMY 2014)	32 (KOVENDAN et al. 2013)

2.4.1 Króm

A króm háromértékű formája a szervezet számára esszenciális nyomelem; szerepe van a glükóz, zsír, és fehérje anyagcserében. Toxikus hatással a króm hatértékű formája bír, mely szennyezési forrásának a festékipar és a fotólaboratóriumi szennyvizek tekinthetőek.

A Cr(VI) rendkívül erős oxidálószer, átjut a sejtmembránon, mindamellett fehérje-precipitáló hatása is ismert (MÉZES 2009). A Cr(VI) mutagén hatással is bír: belőle a sejtekben Cr(III) képződik, mely a DNS foszfátcsoportjához kötődik (GREGUS 2011).

2.4.2 Cink

A cink létfontosságú elem, felszívódását homeosztatisz folyamatok szabályozzák, így csak extrém nagy dózisoknál jelentkezhethet toxikózis. Hatására a fejlődő magzat elhal, vagy életképtelen lesz (MÉZES 2009).

2.4.3 Réz

A réz kis mennyiségben létfontosságú elem; a hemoglobinképzésben, valamint a különböző enzimrendszerek működésében játszik fontos szerepet. Nagy mennyiségben juthat azonban a környezetbe gombaölő és csigairtó szerként való alkalmazása miatt, valamint mikroelem-műtrágyák révén.

A réz elsősorban a membránlipidek peroxidációja, valamint az enzimek gátlása révén fejti ki toxikus hatását, ami a sejtek funkcionális, valamint morfológiai károsodását okozza (LEHEL és LACZAY 2011).

2.4.4 Kadmium

A kadmium természetes körülmények között a cinktartalmú ércekben fordul elő. Ezen kívül a fémfeldolgozó iparban széleskörűen használják galvanizálásra, elemek, és akkumulátorok gyártására, valamint festékek és műanyagok alkotórészeként is használatos. Az ipari emisszió révén nagy mennyiségben jut ki a természetbe.

A kadmium cinkhez való nagyfokú hasonlósága miatt a metallothioneinek szintézisét indukálja, és nagymértékben kötődik is hozzá. Proteázok hatására azonban a komplex elbomlik és a szabaddá váló Cd^{2+} -ionok a sejtek súlyos károsodását okozzák. A kadmium cinkantagonista tulajdonsága miatt pedig a cinket helyettesíti a cinktartalmú enzimekben, ami számos funkciózavart okozhat (LEHEL és LACZAY 2011). Gátolja a citokróm P450 szintézisét és a DNS-hez is képes kötődni, legfőképp a mitokondriális DNS-hez (MÉZES 2009).

2.4.5 Nikkel

A nikkel, a kadmiumhoz hasonlóan cinkantagonista elem (MÉZES 2009).

2.4.6 Higany

A higany elsősorban a mezőgazdasági tevékenység révén juthat ki nagy mennyiségben a környezetbe, higanytartalmú fungicidekkel csávázott vetőmagokkal. A talajok higanytartalmú szennyvíziszappal való terhelése is fontos veszélyforrás. Korábban pedig gyógyszerként is felhasználtak szerves higanytartalmú vegyületeket. Általánosságban elmondható, hogy a szerves higanyvegyületek toxikusabbak a szervesetleneknél, azonban a különböző higanyvegyületek a környezetben egymásba átalakulhatnak.

Toxikus hatásuk lényege, hogy a higany a fehérjék két szomszédos szulfhidril-csoportját megköti, azokkal gyűrűs vegyületet alkotva. Ezáltal bénítja az enzimek funkciókat, mely különösen kifejezett a membrán ATP-áz enzimnél, ami az oxidatív foszforilációt gátolja. A kötődés növeli a sejtek passzív permeabilitását, aminek következtében az intracelluláris térből megnövekszik a víz és egyéb anyagok kiáramlása (LEHEL és LACZAY 2011).

2.4.7 Arzén

Az arzén kis mennyiségben megtalálható a talajokban és az élővizekben, azonban vulkanikus területeken nagyobb mennyiségben is előfordulhat. Általános elterjedtsége miatt fontos szennyezőforrásnak számít. Háromértékű vegyületeit a növényvédelemben, gyógyászatban és festékgyártásban használják, valamint az ércfeldolgozás során keletkező melléktermék. Ötértékű vegyületeit kártevőirtásra, fakonzerválásra, valamint csávázásra használják. Az elemi arzén nem toxikus, azonban oxigén hatására toxikus arzénvegyületek keletkeznek belőle, melyek

erősen mérgezőek. A higannyal ellentétben, a szerves arzénvegyületek kevésbé toxikusak, mint a szervetlenek.

A háromértékű arzén hatásmechanizmusa a higanyéval megegyezik: a fehérjék szulfhidrilcsoportjával gyűrűs vegyületet alkotva bénítja az enzimek funkciókat, kiváltva az oxidatív enzimekét. Az ötértékű forma a nagy energiatartalmú kötésekkel a foszfátokat kiszorítja, ezáltal gátolja az oxidatív foszforilációt (LEHEL és LACZAY 2011).

3. ANYAG ÉS MÓDSZER

3.1 Kísérleti állomány

3.1.1 Zebradánió

A kísérletek során használt zebradániókat a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén tartottam állandó vízfolyást biztosító recirkulációs rendszerben (Tecniplast ZebTec, Buguggiate, Olaszország). AB vonalból származó, vad típusú, ivarérett (6-12 hónapos) egyedeket használtam, amelyeket 3 literes polikarbonát medencékben (maximum 30 egyed/medence), állandó vízminőségi paraméterek ($25,0 \pm 2,0$ °C víz hőmérséklet, $7,5 \pm 0,2$ pH, 525 ± 50 μ S vezetőképesség, vízkeménység $< 0,5$ °NK, oldott O₂-szint $> 90\%$) és fotoperiódus (14 óra világos: 10 óra sötét ciklus) mellett tartottam (13. ábra). Naponta kétszer, Zebrafeed (Sparos, Olhão, Portugália) típusú táppal, valamint kiegészítésként kétnaponta frissen keltetett *Artemia salina* nauplius lárvával ettem a halakat.



13. ábra: A zebradániók tartására használt intenzív rendszer a SZIE Halgazdálkodási Tanszékén.

3.1.2 Ponty

A kísérletek során használt pontyok a Dinnyési Halgazdaságból, valamint a Jászkiséri Halas Kft.-től származtak (Dinnyési tükrös és Szarvasi P31-es tájfajták) melyeket a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékének intenzív haltartó és halnevelő rendszerében (Sentimento Kft., Érd, Magyarország) tartottam. Pikkelyes és tükrös, 1,5-2 éves, 100-400 grammos hím egyedeket használtam, melyek 3 m³-es medencékben (maximum 150 egyed/medence), állandó vízminőségi paraméterek ($23,0 \pm 2,0$ °C víz hőmérséklet, $7,5 \pm 0,2$ pH, 230 ± 2 mV redoxpotenciál, $4,0 \pm 1,0$ mg/L oldott O₂-szint) mellett tartottam (14. ábra). Naponta kétszer, 10 g/ttkg Aqua Uni (Aqua Garant, Pöchlarn, Ausztria) típusú táppal ettettem őket.



14. ábra: A pontyok tartására használt intenzív rendszer a SZIE Halgazdálkodási Tanszékén.

3.2 Spermavétel

3.2.1 Zebradánió

A zebradánió hímeiktől fejés útján nyertem spermát. Fejés előtt a halakat 0,06%-os tricain-metánszulfonsav oldatban (MS-222, pH=7,0, Acros Organics, Geel, Belgium) altattam, majd hasukkal felfelé rögzítettem az egyedeket, egy nedves szivacson ejtett nyílásba helyezve őket. Ezután az ivarnyílás környékét szárazra töröltem, majd a fejést mikroszkóp alatt végeztem el (Leica S6E típusú mikroszkóp, 10×-es nagyítás). Ennek során egy csipesz segítségével óvatos nyomást fejttem ki a hasfalra, majd az ivarnyílásban megjelenő spermát kalibrált, 5 µL térfogatú üveg kapilláris cső segítségével felfogtam (Marienfeld-Superior, Herlev, Dánia; 15. ábra), ezáltal megbecsülhető volt az összegyűjtött sperma mennyisége. A különböző egyedektől származó spermát 50 µL pontyféléknél használt immobilizáló oldatba (200 mM KCl, 30 mM Tris, pH=8,0, SAAD és BILLARD 1987) gyűjtöttem. Összesen 10 µL ivarterméket gyűjtöttem az egyedektől (6×-os hígítás), ami a motilitásvizsgálati kísérletek során átlagosan 10 ± 2 egyedtől származott, és $26 \pm 8 \times 10^6$ spermiumot tartalmazott, míg a termékenyítési kísérletekhez használt sperma átlagosan 19 ± 8 egyedtől származott, és $16 \pm 8 \times 10^6$ spermiumot tartalmazott. A spermát felhasználásig olvadó jégen tároltam. A lefejt egyedeket friss rendszervízben történő ébresztés után visszahelyeztem a medencékbe. Ugyanazon egyedeket legalább egy hét elteltével fejtem újra.



15. ábra: A zebradánió fejése (Fotó: Horváth Ákos).

3.2.2 Ponty

A pontyoktól szintén fejés útján nyertem spermát. A fejést megelőzően 1-2 nappal hormonkezeléssel stimuláltam a spermiációt: a halakat 0,04%-os fenoxi-etanol oldatban altattam (Acros Organics, Geel, Belgium), majd 4 mg/mL koncentrációban, desztillált vízben feloldott, szárított, porított pontyhipofízissel oltottam be intraperitoneálisan a tejeseket (16. ábra). Testtömeg-kilogrammonként 2 mg hipofízist injektáltam a halakba, amelyet 1 mL-es, 29 G-s

inzulinos fecskendővel (Chirana, Ótura, Szlovákia) juttattam a tejesek hasüregébe. Az egyedeket oltás után elkülönítve visszahelyeztem a medencébe.

Fejés előtt a tejeseket az előbbiekkal megegyezően altattam, majd benedvesített papírtörölkőre helyeztem őket. Az ivarnyílást szárazra töröltem, majd a hasfalra kifejtett nyomás következtében távozó ivarterméket 2 mL-es fecskendő (BD Discardit™ II, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanyolország) segítségével szívtam fel (17. ábra). A fecskendőbe felszívott spermát ezután 1,5 mL-es Eppendorf-csőbe (VWR International Ltd., Radnor, USA) juttattam. A különböző egyedektől származó ivartermékeket külön-külön gyűjtöttem, melyek koncentrációja átlagosan $18 \pm 6 \times 10^9$ spermium/mL volt. A mintákat felhasználásig olvadó jégen tároltam. A lefejt egyedeket visszahelyeztem a medencébe.



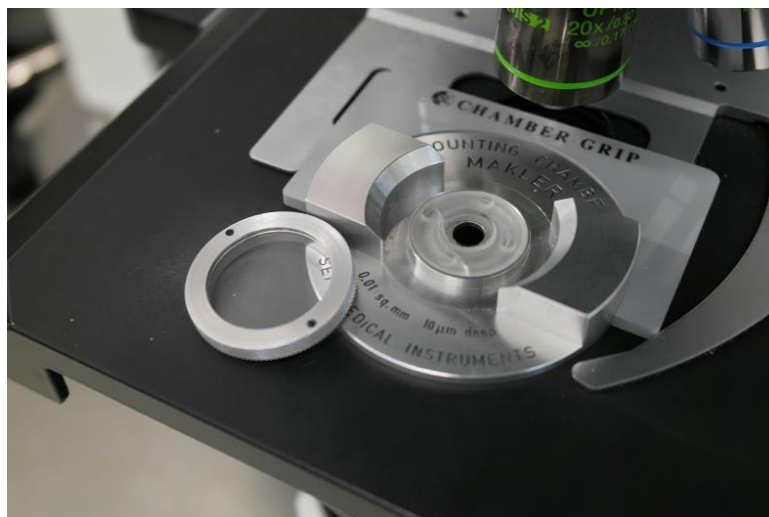
16. ábra: A pontyok hipofizálása (Fotó: Pataki Bernadett).



17. ábra: A pontyok fejése (Fotó: Jelena Lujic).

3.3 A sperma minőségének ellenőrzése

A spermaminták koncentrációját zebradánió és ponty esetében is Bürker-Türk típusú sejtszámláló kamrában határoztam meg. A frissen fejt sperma progresszív motilitásának meghatározását egy Olympus BX41 típusú mikroszkóphoz csatlakoztatott Számítógépes Spermvizsgáló Rendszer (Computer-Assisted Sperm Analysis, CASA; Sperm Vision™ v. 3.7.4., Minitube of America, Venture Court Verona, USA) segítségével végeztem el. A spermiumok azonosítása az alábbi beállítások szerint történt mindkét halfaj esetében: (1) progresszív motilitás küszöbértéke: a kiindulási és végpont közötti egyenes távolság hossza (DSL) $>5 \mu\text{m}$; (2) pixel/ μm arány: 151/100; (3) fej terület méret: $1\text{-}100 \mu\text{m}^2$. A spermát Makler kamrában aktiváltam (SEFI Medical Instruments, Haifa, Izrael, 18. ábra), amihez zebradánió és ponty esetében is az egyedek tartására szolgáló rendszervízet használtam. Mindkét típusú rendszervízhez előzetesen 1%-os koncentrációban BSA-t (Albumin bovine serum Cohn Fraction V, VWR International Ltd., Radnor, USA) kevertem. A rendszervízben található különböző ionok koncentrációit az M2. melléklet tartalmazza.



18. ábra: A számítógépes spermavizsgálat során, a sperma aktiválásához használt Makler kamra (Fotó: Kása Eszter).

Zebradánió esetében az aktiválás során 2,5 μL rendszervízet használtam, melybe a kevert mintából származó 0,5 μL spermát kevertem ($6 \times 6 = 36\times$ -os hígítás). Ponty esetében pedig a friss, hígítatlan minták vizsgálata során 50 μL rendszervízbe juttattam 0,1 μL spermát ($501\times$ -es hígítás), annak koncentráltabb volta miatt.

3.4 Tesztanyagok

Kísérleteim során az alábbi vegyületekkel dolgoztam (Sigma Aldrich, St. Louis, USA):

- króm(III)-nitrát-nonahidrát ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$),
- cink-nitrát-hexahidrát ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$),
- réz-nitrát-trihidrát ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3 \text{H}_2\text{O}$),
- kadmium-nitrát-tetrahidrát ($\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$),
- nikkell-nitrát-hexahidrát ($\text{Ni}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$),
- higany(II)-nitrát-monohidrát ($\text{Hg}(\text{NO}_3)_2 \times \text{H}_2\text{O}$),
- arzén-trioxid (As_2O_3).

A törzsoldat elkészítése során az anyagokat a már említett immobilizáló oldatban oldottam fel. Az As_2O_3 esetében ultrahangos mikrodiszpergálásra (szonikálásra) volt szükség a teljes beoldódáshoz, melyet 40%-os amplitúdón, 4×4 percig végeztem (Branson Digital Sonifier[®] Models 250, Danbury, USA). A törzsoldatokat $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ -on tároltam, legfeljebb 7 napig. Az elkészített törzsoldatok koncentrációját és azok ozmolalitását az M3. melléklet részletezi.

3.5 A sperma hígítása és kitettsége

Zebradánió esetében több egyedtől származó, kevert mintákkal dolgoztam a kísérletek során, míg pontyban egyedi, független mintákon végeztem el a különböző ismétléseket.

A tesztelendő koncentrációk meghatározása előzetes dózistartomány-kereső vizsgálatok alapján történt. Ponty esetében a frissen lefejt egyedi mintából 10 µL-t először tovább hígítottam 50 µL immobilizáló oldatban, hogy elérjem a zebradániónál is alkalmazott 6×-os hígítási arányt, majd ezt követően a mintákat ugyanúgy kezeltem zebradánióban és pontyban is: 10 µL hígított spermát tovább hígítottam 10 µL toxikus anyagot tartalmazó immobilizáló oldattal (2×-es hígítás), így elérve a végső vizsgálati koncentrációkat (5. táblázat). Következésképpen zebradánióban a spermavizsgálati kísérletek során $4 \pm 1 \times 10^6$ spermium, míg a termékenyítési kísérletek során $3 \pm 1 \times 10^6$ spermium került egy tesztoldatba, pontyban pedig $3 \pm 1 \times 10^7$ hímivarsejtet tartalmazott egy kezelés.

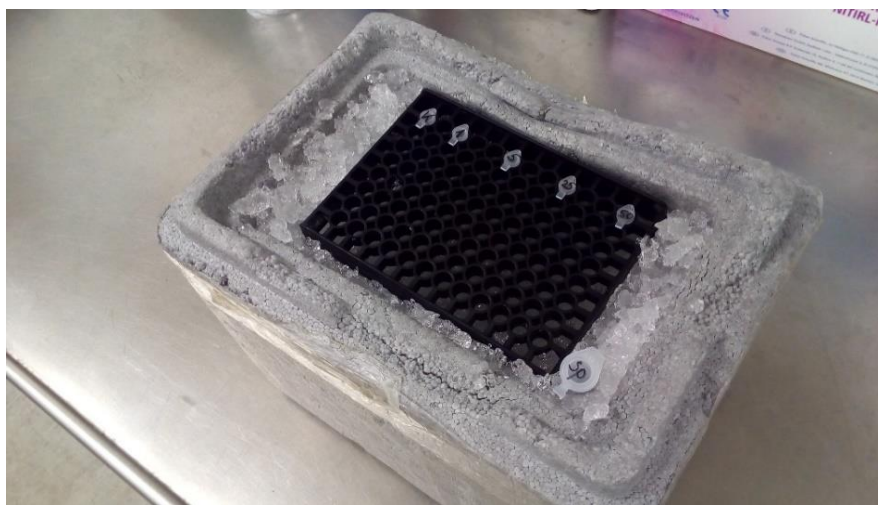
5. táblázat: A zebradánió és ponty spermán tesztelt nehézfém-ionok és vegyületeik koncentrációi (mg/L), valamint azok anyagmennyisége (mM)

	Zebradánió (mg/L)	Ponty	Zebradánió (mM)	Ponty
Cr³⁺	50, 100, 150, 200			
Cr(NO ₃) ₃ × 9 H ₂ O	385, 769, 1154, 1538		0,96; 1,92; 2,88; 3,84	
Zn²⁺	50, 100, 150, 200			
Zn(NO ₃) ₂ × 6 H ₂ O	227, 455, 682, 910		0,76; 1,53; 2,29; 3,06	
Cu²⁺	1, 5, 25, 50			
Cu(NO ₃) ₂ × 3 H ₂ O	4, 19, 95, 190		0,016; 0,079; 0,394; 0,787	
Cd²⁺	1, 5, 25, 50			
Cd(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	3, 14, 69, 137		0,009; 0,044; 0,222; 0,445	
Ni²⁺	600, 800, 1000, 1200			
Ni(NO ₃) ₂ × 6 H ₂ O	2973, 3964, 4955, 5946		10,22; 13,63; 17,04; 20,44	
Hg²⁺	0,5, 1, 2,5, 5			
Hg(NO ₃) ₂ × H ₂ O	0,9, 1,7, 4,3, 8,5		0,0024; 0,0050; 0,0124; 0,0250	
As³⁺	50, 100, 150, 200	1, 5, 25, 50		
As ₂ O ₃	66, 132, 198, 264	1,3, 6,6, 33,0, 66,0	0,33; 0,67; 1,00; 1,33	0,0067; 0,0334; 0,1669; 0,3337

Minden minta esetében egy kezeletlen kontroll csoportot is vizsgáltam párhuzamosan, melyet azonosan, 1:1 arányban hígítottam pontyféle immobilizáló oldattal a kísérlet kezdetén, a kezelt minták toxikus hígításával egyidőben. A toxikus anyagnak való kitettség a sperma motilitási paramétereinek vizsgálata esetén 4 óra, míg a termékenyülési százalék és embriogenezis vizsgálata során 30, valamint 120 perc volt. Az expozíció alatt a mintákat végig olvadó jégen tároltam (19. ábra). A fejtést követően maximum 30 percen belül elvégeztem a sperma hígítását a különböző koncentrációjú nehézfém-oldatokkal.

3.6 Toxikológiai célú spermavizsgálat

A spermavizsgálat végpontjai azok a motilitási paraméterek voltak, melyeket leggyakrabban vizsgáltak korábban a halspermán végzett *in vitro* toxikológiai célú kísérletekben. Ezek a progresszív motilitás (PMOT, %), továbbá egy sebességi paraméter (ívsebesség, VCL, $\mu\text{m/s}$) és egy egyenességi paraméter (a spermiumok mozgásának egyenestől számított eltérése, LIN, %) voltak. Ezen végpontok rögzítését a különböző koncentrációjú nehézfém-oldatokkal történő hígítást követően, a 4 órás expozíció minden 30. percében végeztem el.



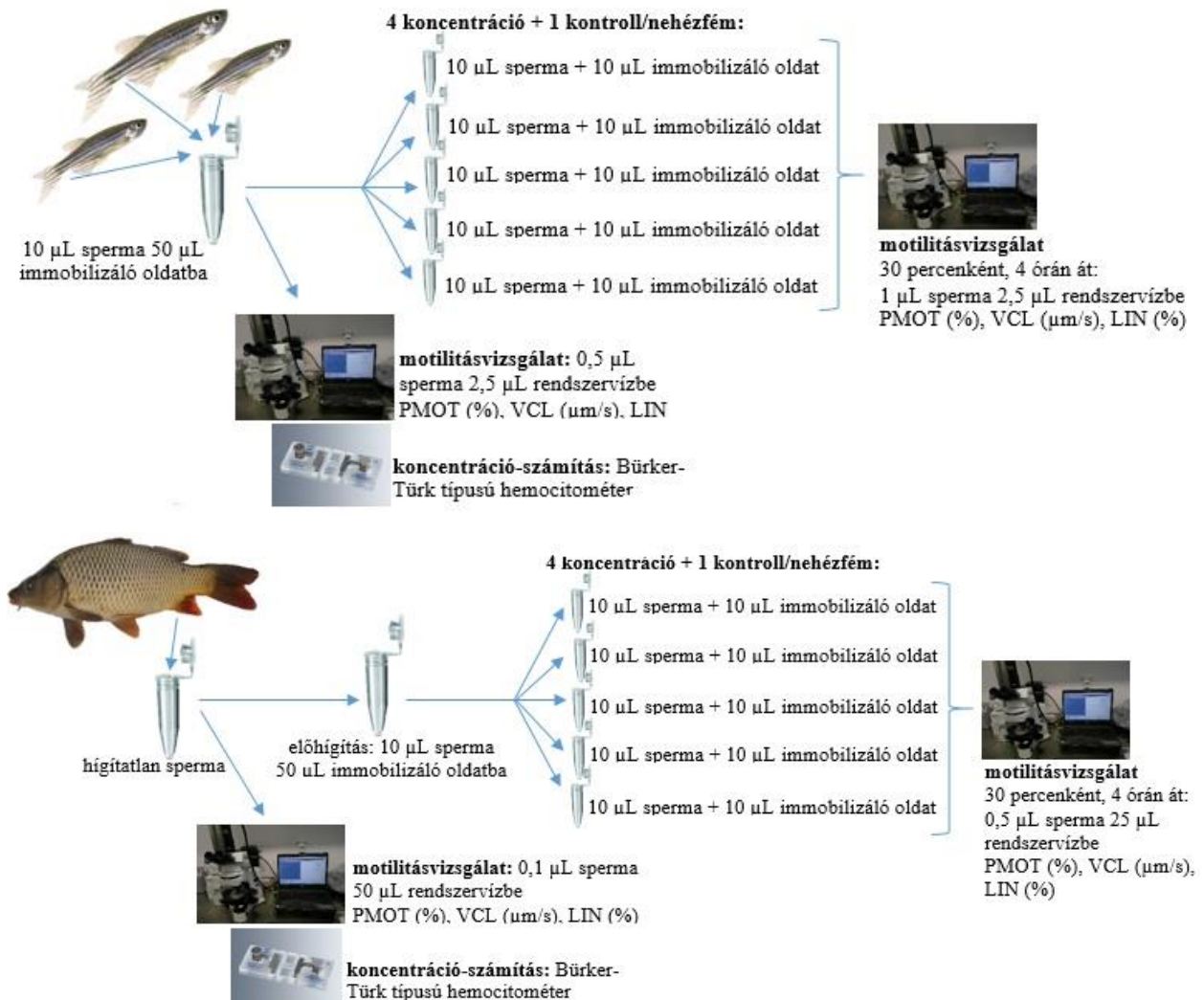
19. ábra: A spermaminták nehézfémeknek történő kitettséggel történő tárolása olvadó jégen.

A spermavizsgálat során, zebradánió esetében $2,5 \mu\text{L}$ rendszervízbe $1 \mu\text{L}$ toxikus anyaggal hígított spermát juttattam, míg pontyspermában nagyobbfokú hígításra volt szükség, így $25 \mu\text{L}$ rendszervízbe $0,5 \mu\text{L}$ nehézfémnek kitett spermát pipettáztam. A zebradánió, valamint ponty esetében alkalmazott hígítások arányát az 6. táblázat összesíti.

6. táblázat: Zebradánió- és pontysperma esetében alkalmazott hígítási arányok. A vastag betűvel kiemelt hígítások képezik a végső hígítási arányt. A vékony betűvel szedett hígítás nem számít bele a végső hígítási arány kialakításába.

	Zebradánió	Ponty
1. Friss sperma hígítása	6×	-
Motilitásvizsgálat	6×	501×
2. Előhígítás	-	6×
3. Sperma hígítása a toxikus anyaggal	2×	2×
4. Motilitásvizsgálat	3,5×	51×
Összesen	42×	612×

A különböző mérési időpontokban legalább két aktivációt végeztem mintánként; aktivációnként pedig legalább két felvételt készítettem a minél precízebb analízis érdekében. A felvételek készítése minden esetben az aktivációt követő 5 másodpercen belül történt. Mindkét halfajban a kísérleteket 5 független mintával végeztem el: zebradánió esetében 5 különböző, több egyedtől származó kevert spermamintát használtam, míg ponty esetében 5 különböző egyedtől származó, független spermamintán végeztem el a kísérleteimet. A zebradánió és ponty fajban elvégzett motilitásvizsgálatok folyamatát a 20. ábra szemlélteti.



20. ábra: Toxikológiai célú motilitásvizsgálatok folyamatábrája zebradánió és ponty esetében.

3.7 A termékenyülés, valamint az embriogenezis vizsgálata zebradánióban

3.7.1 Ikragyűjtés

A kísérleteket megelőző délután az ikrás állományt 1 literes duplafalú szaporítóedényekbe helyeztem ki tejesekkel, 1:1 ivararányban, maximum 2 ikrás és 2 tejes egyedet helyezve egy szaporítóedénybe, ivar szerint válaszfalal elkülönítve (21. ábra), ami megakadályozta a

zebradániók kísérlet előtti ívását. Az ikrás egyedeket a kísérlet reggelén, a villany – fényprogram által vezérelt - felkapcsolódása után gyűjtöttem össze.

Az ikra fejése előtt az ikrásokat is 0,06%-os MS-222 oldatban bódítottam. Ezt követően az egyedeket nedves papírtörülőre helyeztem, az ivarnyílást szárazra töröltem, majd az ikrát 6 cm átmérőjű Petri-csészébe fejtem szárazon. Több egyedtől származó ikrát gyűjtöttem keverve, 50-100 db ikraszemet fejve egy Petri-csészébe, így elérve a 30 000:1 spermium: ikra arányt kezelésenként. A kellő ikramennyiség összegyűjtése után a Petri-csészéket lefedtem, az ikratétel kiszáradását elkerülendő. Összesen 5 Petri-csészébe fejtem így ikrát, mely egy nehézfém adott expozíciós idő melletti 4 különböző koncentrációjának és kontroll csoportjának tesztelésére szolgált. A lefejt egyedeket friss rendszervízben történő ébresztést követően visszahelyeztem a medencékbe. Ugyanazon egyedeket legalább egy hét elteltével fejtem újra.



21. ábra: A zebradánió ikrások felkészítéséhez használt szaporítóedények. Baloldalon az ikrás, jobboldalon a tejes egyedek láthatóak, a közepén található válaszfallal elszeparálva.

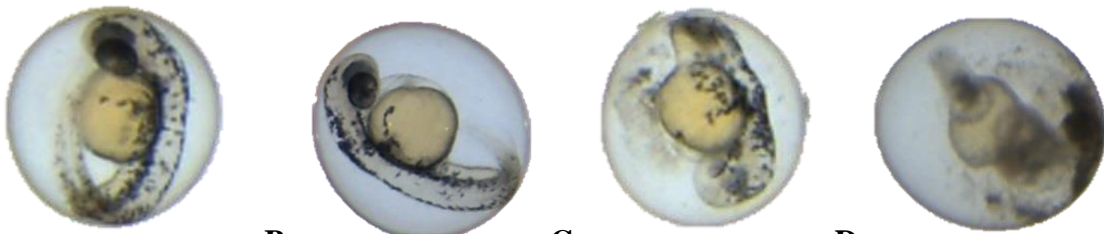
3.7.2 Termékenyítés

Az ikratételeket a fejest követő 10 percen belül termékenyítettem. A termékenyítés során az adott ikratételre a 30, valamint 120 perces nehézfém-expozíciónak kitett, 20 μ L immobilizált spermát juttattam, melyet kb. 1 mL hozzáadott rendszervízzel aktiváltam (22. ábra). Ezt követően 5-10 percen belül az ikratételeken vizet cseréltem, majd áthelyeztem őket 10 cm átmérőjű Petri-csészékbe, amiket rendszervízzel öntöttem fel. A Petri-csészéket 26 °C-on inkubáltam 48 órán át, mely során egyszer – 24 óra után - vizet cseréltem rajtuk, valamint a nem termékenyült ikraszemeket és az elpusztult embriókat eltávolítottam.



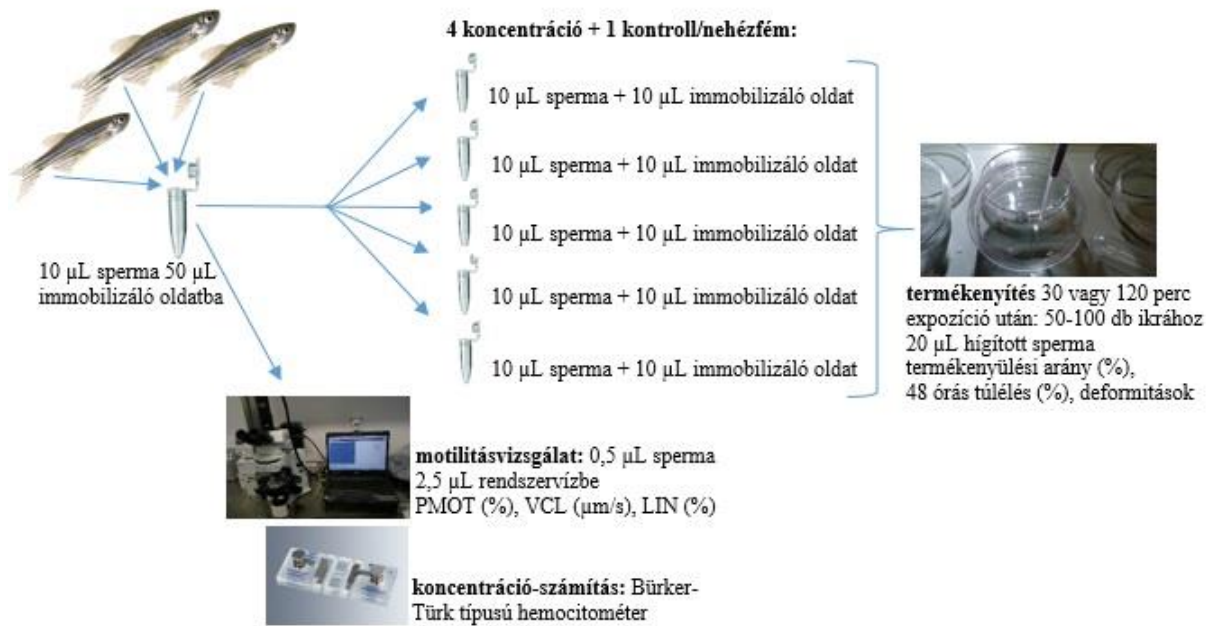
22. ábra: Az ikratételek termékenyítése a különböző koncentrációjú nehézfémeknek, különböző expozíciós ideig kitett spermával.

A kísérlet végpontjai a termékenyülési százalék (%), valamint az embriók 48 óras korban vizsgált túlélése a termékenyült ikrák számához viszonyítva (%) voltak. A termékenyülési százalék megállapítása a termékenyítést követően 24 órával történt, 26 szomitás illetve Prim-5 fejlettségi állapotban. Ezenkívül vizsgáltam a különböző deformitásokat és fejlődésbeli rendellenességeket 24 óra (26 szomitás/Prim-5 állapot) és 48 óra (Long-pec állapot) elteltével is, mely során az alábbi rendellenességek kialakulását vizsgáltam: sziködéma, perikardiális ödéma, fej- és szemfejlődési rendellenességek, farok- és gerinctorzulás, dezintegrált test (23. ábra).



A **B** **C** **D**
23. ábra: A zebradánió embriókban vizsgált fejlődési rendellenességek. **A:** normál embrió, **B:** sziködéma és perikardiális ödéma, **C:** fej- és szemfejlődési rendellenesség, farok- és gerinctorzulás, **D:** dezintegrált test.

Kísérleteimet minden nehézfém és expozíciós idő esetében 3 ismétlésben végeztem el. A zebradánió fajban elvégzett termékenyítési kísérletek folyamatát a 24. ábra szemlélteti.



24. ábra: Zebradánió fajban elvégzett termékenyítési kísérletek folyamatábrája.

3.8 Statisztikai elemzés

Kísérleteim során a friss sperma toxikus anyaggal történő hígítás előtti motilitási értékeit referencia értéként feltüntettem, azonban a statisztikai értékelésben csak a termékenyítési kísérletekben szerepelnek, a különböző kísérletekben használt sperma kiindulási minőségének összehasonlítása végett.

A kapott adatsorok eloszlásának vizsgálata Kolmogorov-Szmirnov teszt segítségével, a varianciák homogenitásának vizsgálata pedig Bartlett-próba segítségével történt. A különböző koncentrációk, az expozíciós idők, valamint e kettő interakciójának hatását a motilitási paraméterekre, a termékenyülési százalékra és a 48 órás túlélésre ismétléses kétszemponos variancia-analízissel (ANOVA) vizsgáltam, utótesztként Bonferroni-tesztet alkalmaztam annak érdekében, hogy kiderítsem, pontosan mely koncentrációk mely expozíciós időknél voltak hatással a vizsgált paraméterekre. Az összehasonlítás minden esetben az azonos expozíciós idejű kontroll értékekhez történt. Az embrionális deformítások kialakulásának arányát, az ANOVA alkalmazhatósági feltételeinek nem-teljesülése miatt, nemparaméteres Kruskal-Wallis teszttel vizsgáltam, utótesztként pedig Dunns-próbát alkalmaztam.

Azoknál a mérési időpontoknál, ahol a vizsgált változó értéke a kontroll értékéhez képest legalább 50%-os csökkenést mutatott, dózis-hatás görbe illesztésével félhatásos koncentrációkat (EC_{50}) számoltam, melyek a vizsgált változó kontroll értékét a felére csökkentik. A dózis-hatás görbék illesztése a vizsgált változók szerint történt: kvantális változók esetében (PMOT, LIN, termékenyülési százalék) probit modellel, míg kvantitatív változó esetében (VCL) logaritmus

transzformációval végeztem el a görbeillesztést (az OECD 54-es szabvány alapján). Az adott expozíciós idő mellett kapott EC_{50} -értékeket t-próbával hasonlítottam össze, mint ahogy a spermavizsgálat során, a kísérlet kezdetén és végén mért kontroll értékeket, valamint a termékenyítési kísérletek során a friss sperma PMOT értékeit is a különböző kísérletekben. A szignifikancia-szint minden esetben $p=0,05$ volt.

Az eredmények statisztikai kiértékelését és a dózis-hatás görbék illesztését GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA) statisztikai program segítségével végeztem.

4. EREDMÉNYEK

4.1 Toxikológiai célú spermavizsgálat

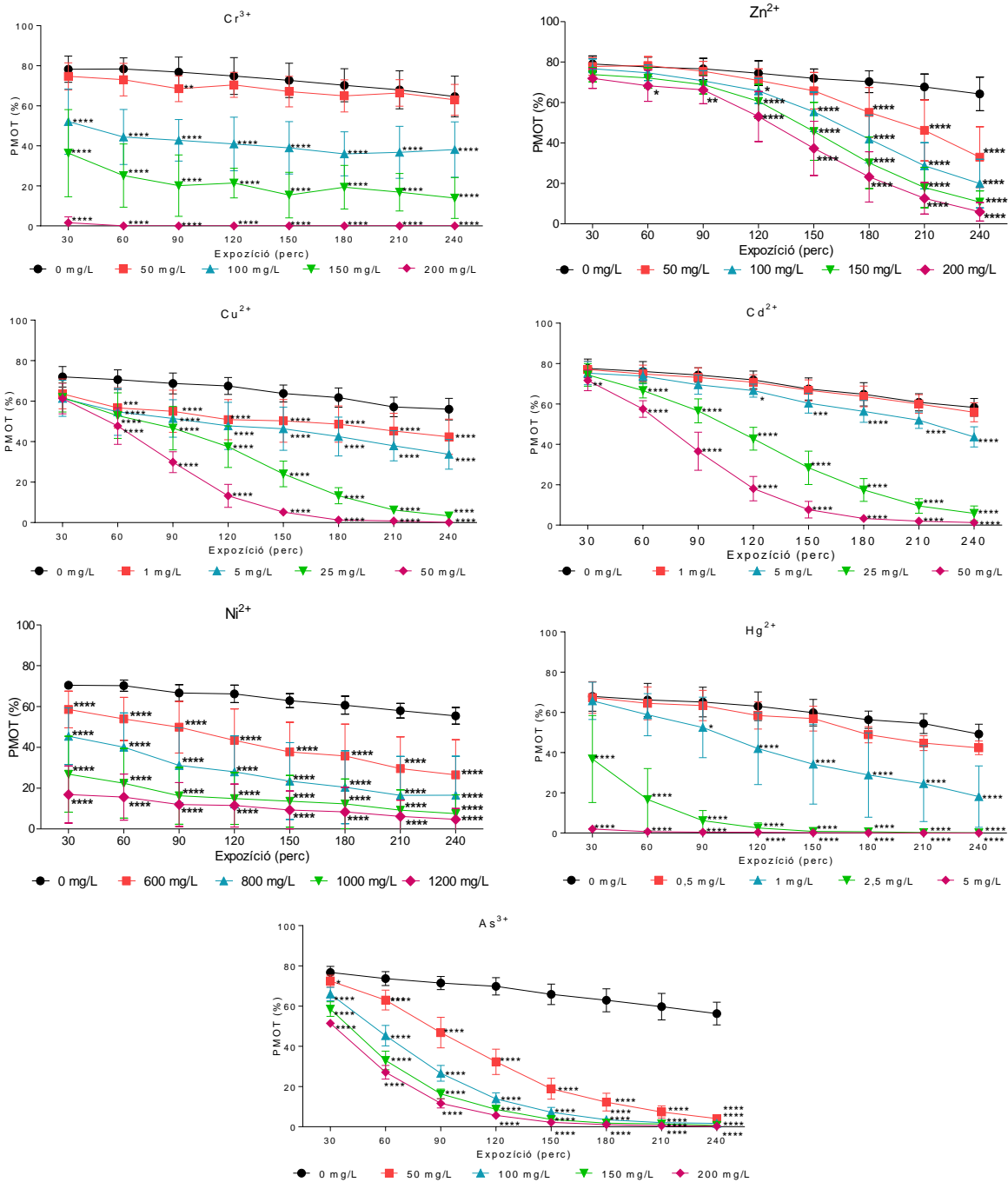
4.1.1 A nehézfémek sperma progresszív motilitására (PMOT) gyakorolt hatása

4.1.1.1 Zebradánió

A friss minták PMOT értéke $76 \pm 6\%$ ($n=35$) volt. A nehézfém kezelések hatására minden esetben dózis-hatás reakció volt megfigyelhető a PMOT értékén (25. ábra). A kontroll minták PMOT értékei minden esetben szignifikánsan csökkentek az expozíció 30. és 240. perce között ($p=0,0001$ és $0,0357$ között, $n=5$). Minden nehézfém esetében az expozíciós idő, valamint a koncentráció is szignifikáns hatást gyakorolt a PMOT értékekre ($p<0,0001$ minden esetben). Mindamellet szignifikáns interakció volt megfigyelhető a vizsgált két változó között minden nehézfém-kezelés esetében ($p<0,0001$ minden esetben).

A Zn^{2+} , valamint Cu^{2+} vizsgálata során az expozíciós idő 30. percében még nem figyeltem meg változást a PMOT értékében, azonban az expozíciós idő növelésével a PMOT egyre nagyobb mértékben csökkent. A Hg^{2+} , Cd^{2+} , valamint az As^{3+} esetében már az expozíciós idő 30. percében látszik a nehézfémek PMOT értékére gyakorolt szignifikáns hatása, ami az expozíciós idő növelésével párhuzamosan nőtt. A Cr^{3+} , valamint Ni^{2+} esetében is megfigyelhető, hogy a toxikus anyag hatása már az expozíció 30. percében megnyilvánult, azonban ez a hatás az idő előrehaladtával csak minimális mértékben növekedett.

A különböző nehézfémek vizsgálata során kapott eredményeket összehasonlítva jól látszik, hogy míg a Cr^{3+} , Ni^{2+} és Hg^{2+} esetében már az expozíciós idő 30. percétől csökkent a PMOT értéke a kontrollhoz viszonyítva 50%-kal, valamint az As^{3+} vizsgálata során is már a 60. percétől, addig a Cu^{2+} és Cd^{2+} esetében 90 perces expozíciós idő volt szükséges e paraméter kontrollhoz viszonyított 50%-os csökkenéséhez, A Zn^{2+} vizsgálata során pedig csak az expozíciós idő 180. percétől volt lehetőség az EC_{50} -értékek megállapítására (7. táblázat).



25. ábra: A zebrafecské-sperma átlagos progresszív motilitása (PMOT, %) szórással (n=5) a különböző koncentrációjú nehézfém-oldatoknak történő kitettség esetén, az expozíciós idő minden 30. percében. Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, **** p<0,0001).

7. táblázat: A zebradánió-sperma progresszív motilitására (PMOT) vonatkoztatott EC₅₀-értékek (mg/L) különböző nehézfémeknek történő kitettség esetén, az expozíció minden 30. percében (ahol becsülhető). A pontyban kapott EC₅₀-értékekhez viszonyított különbséget csillag jelöli (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, p<0,0001).

Expozíciós idő (perc)	Cr ³⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺ (mg/L)	Ni ²⁺	As ³⁺	Hg ²⁺
30	143****				820****		2,7
60	131*				762****	80	2,4
90	126***		5****	25	745****	66****	1,7
120	131		10****	25	698****	54****	1,4
150	125**		14	25	688****	48****	1,2
180	129	80****	15	25	697****	44****	1,2
210	130	72****	13	17***	658****	38	1,1
240	129*	63****	10	13	653****	31****	1,0*

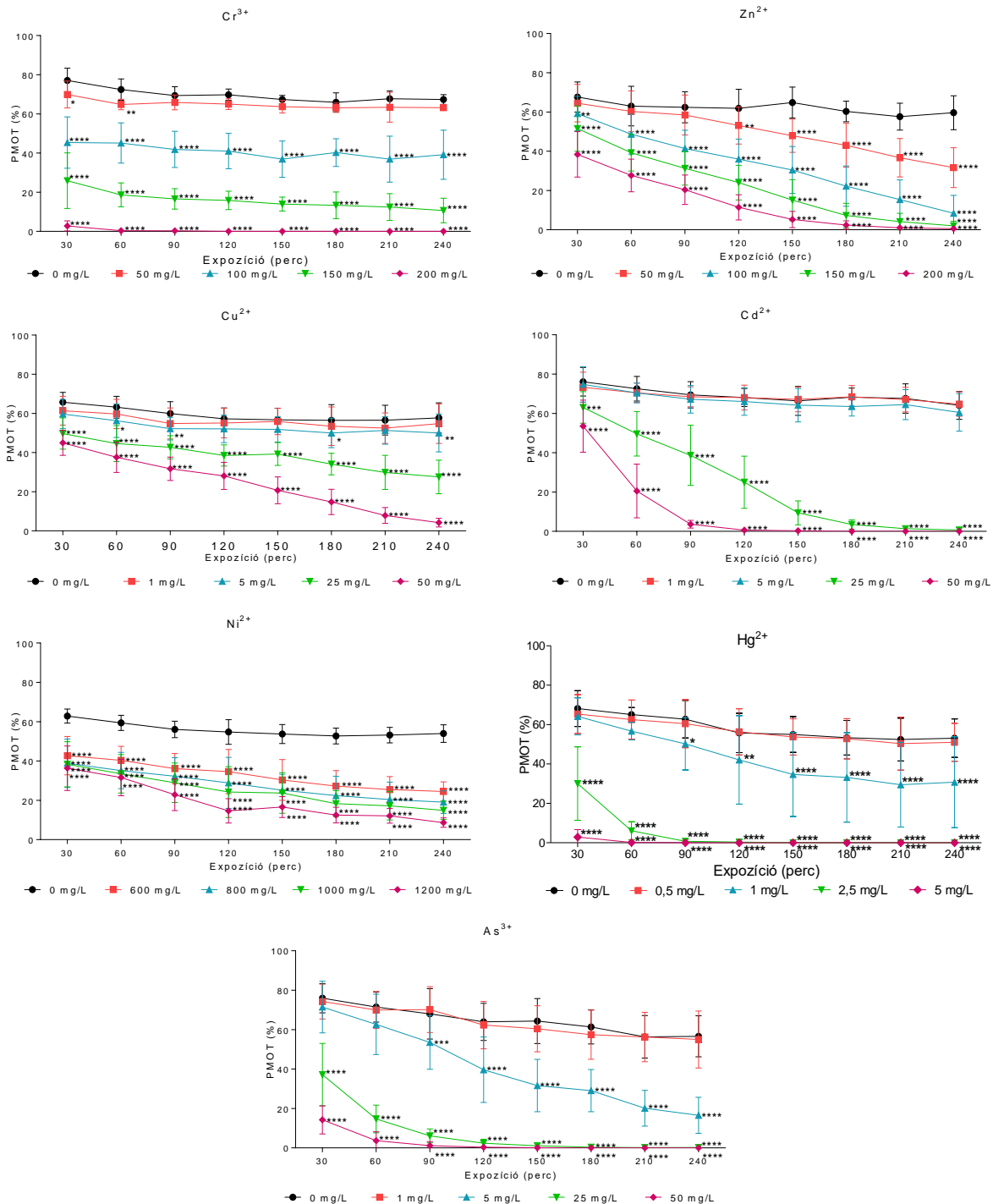
4.1.1.2 Ponty

A hígítatlan pontyspermaminták frissen mért PMOT értéke $88 \pm 4\%$ volt. A nehézfém-kitettség hatására – a zebradánióhoz hasonlóan – minden esetben dózis-hatás válasz jelentkezett (26. ábra). A kontroll minták PMOT értékei 5 nehézfém-kezelés mellett csökkentek szignifikánsan a 4 órás expozíció alatt (As³⁺, Cr³⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, Ni²⁺: p=0,0084 és 0,0358 között, n=5), míg a Cu²⁺ és a Zn²⁺ esetében a kontroll PMOT értékek nem csökkentek szignifikánsan a 240. percig. Az expozíciós idő és a koncentráció hatása minden esetben szignifikánsnak bizonyult (p<0,0001 minden esetben). A vizsgált változók között minden nehézfém-kezelés esetében szignifikáns interakció volt megfigyelhető (Cr³⁺: p=0,0437; minden más esetben p<0,0001).

A zebradánió-spermán mért értékekkel szemben, ahol az expozíciós idő 30. percében 2 nehézfém esetében (Zn²⁺, Cu²⁺) semmilyen hatás nem volt megfigyelhető a PMOT értékén, a pontyspermán már a nehézfém-kitettség kezdetén szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a PMOT-ban minden nehézfém vizsgálata során. A Cr³⁺ és a Ni²⁺ esetében azonban megfigyelhető ugyanaz a hatás a pontyspermán, mint a zebradánió-sperma vizsgálata során: az expozíciós idő növekedésével a toxikus hatás nem növekszik számottevően.

A különböző nehézfémek hatását összehasonlítva elmondható, hogy ponty esetében is a Cr³⁺ és a Hg²⁺ már az expozíció 30. percénél 50%-os csökkenést okozott a PMOT értékében. Az As³⁺ vizsgálata során is 30 perc volt szükséges, holott a zebradánió spermánál csak a 60. perc után jelentkezett az 50%-os csökkenés a PMOT-ban. Megjegyzendő azonban, hogy az As³⁺ volt az egyetlen nehézfém, aminél ponty esetében alacsonyabb koncentrációkat (1, 5, 25 és 50 mg/L) kellett alkalmazni a zebradánió teszteltekhez képest (50, 100, 150 és 200 mg/L), az előzetes dózistartomány-kereső vizsgálatok eredményei alapján. A Cd²⁺ vizsgálata során ugyanúgy a 60. perc után csökkent a PMOT értéke a kontroll felére, valamint a Zn²⁺-kezelés hatására is, holott zebradániósnál csak az expozíció 180. perce után volt megfigyelhető ugyanez a hatás, azonos

koncentrációk mellett. A Ni^{2+} vizsgálata során 90 perc után csökkent 50%-kal a PMOT ponty esetében, azonban zebradánióban már a 30. perc után jelentkezett az 50%-os csökkenés. A Cu^{2+} esetében is a ponty bizonyult kevésbé érzékenynek: míg ez esetben 120 perc kitettség után csökkent a kontrollhoz képest a felére a PMOT, addig a zebradánió-spermán már 90 perc után jelentkezett ugyanez a hatás (8. táblázat).



26. ábra: A pontysperma átlagos progresszív motilitása (PMOT, %) szórással (n=5) a különböző koncentrációjú nehézfém-oldatoknak történő kitettség esetén, az expozíciós idő minden 30. percében. Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (* p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, **** p < 0,0001).

8. táblázat: A pontysperma progresszív motilitására (PMOT) vonatkoztatott EC₅₀-értékek (mg/L) különböző nehézfémeknek történő kitétség esetén, az expozíció minden 30. percében (ahol becsülhető). A zebradánióban kapott EC₅₀-értékekhez viszonyított különbséget csillag jelöli (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, p<0,0001).

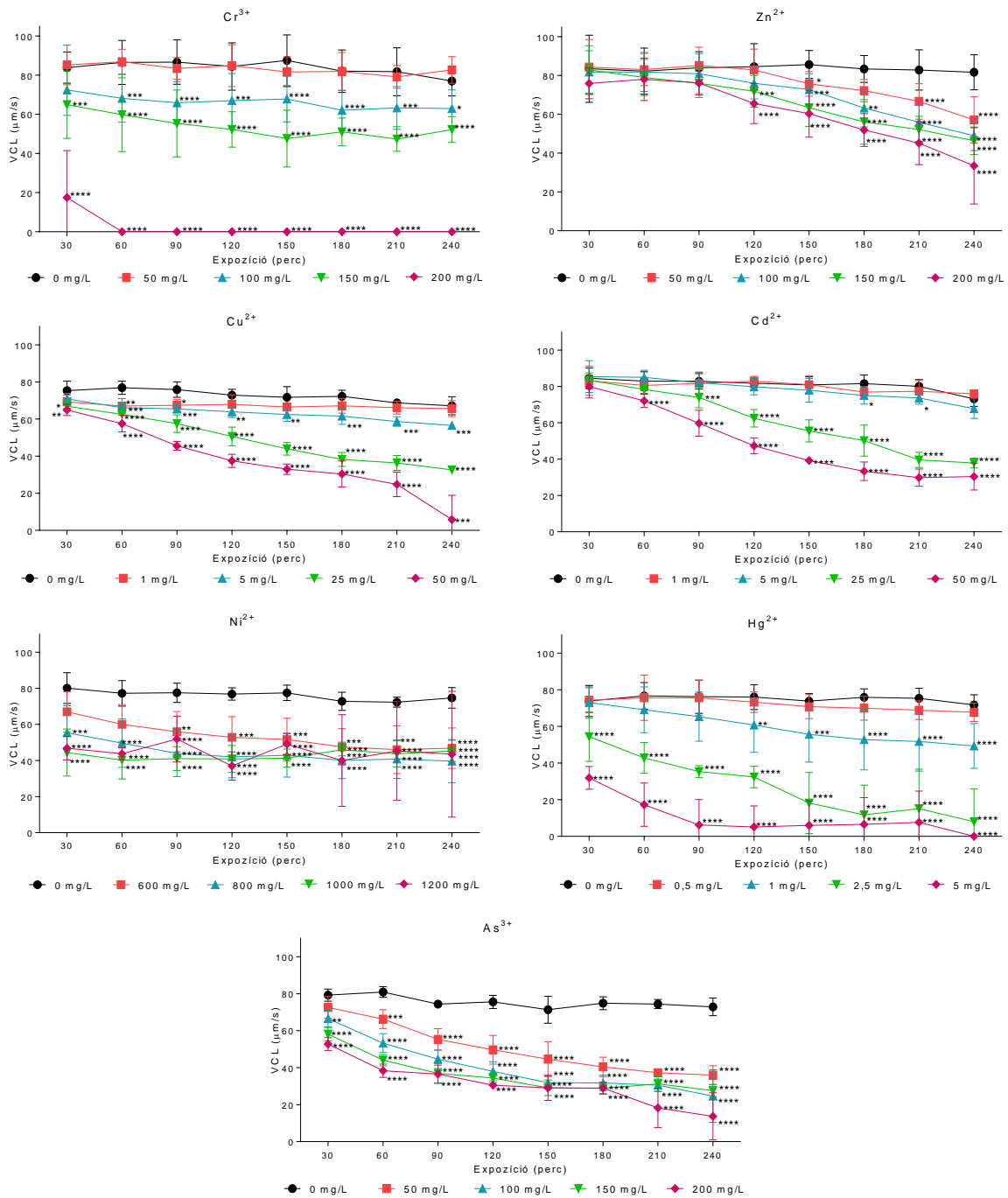
Expozíciós idő (perc)	Cr ³⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺ (mg/L)	Ni ²⁺	As ³⁺	Hg ²⁺
30	127****					25****	2,5
60	134*	114****		25****		24	1,9
90	134***	106****		25	573****	13****	1,4
120	133	107****	15****	25	675****	9****	1,3
150	130**	101****	25	24	552****	6****	1,2
180	132	97****	25	14	578****	6****	1,1
210	126	90****	25	11***	543****	5	1,1
240	126*	74****	25	8	591****	5****	1,1*

A zebradánió, valamint ponty spermájának a PMOT-ra számított EC₅₀-értékeit összehasonlítva megállapítható, hogy e két halfaj spermájának érzékenysége egyedül a Hg²⁺ esetében megegyező: itt nem tapasztalható szignifikáns különbség az EC₅₀-értékek között. A Zn²⁺, Ni²⁺, Cd²⁺ és As³⁺ esetében kapott, szignifikánsan különböző EC₅₀-értékek a ponty esetében alacsonyabbak: e nehézfémek esetében a ponty spermája bizonyult érzékenyebbnek. A Ni²⁺ vizsgálata során viszont a zebradánió-sperma PMOT értéke már az expozíció 30. percétől kezdve mutatott 50%-os csökkenést, míg ponty esetében csak a 90. perctől jelenik meg ilyen mértékű csökkenés a kontrollhoz viszonyítva. A Cu²⁺-kitétséggel szemben viszont a zebradánió-sperma érzékenyebben reagált, mint a pontysperma. Egyedül a Cr³⁺ esetében figyelhető meg, hogy a különböző mérési időpontoknál hol a zebradánió, hol pedig a ponty spermáján számított EC₅₀-értékek voltak szignifikánsan alacsonyabbak: e két faj spermájának érzékenysége a különböző mérési időpontokban eltérő volt.

4.1.2 A nehézfémek spermiumok sebességére (VCL) gyakorolt hatása

4.1.2.1 Zebradánió

A kevert zebradánió-spermaminták nehézfém-kezelések előtti, kezdeti VCL értéke $77 \pm 9 \mu\text{m/s}$ (n=35) volt. A nehézfém-kitétség VCL-re gyakorolt hatását szemlélteti az 27. ábra. A kontroll zebradánió-spermaminták VCL értéke csak 3 nehézfém-kezelés mellett változott szignifikánsan a 4 órás expozíció alatt (As³⁺, Cd²⁺, Cu²⁺: p=0,0066 és 0,0398 között, n=5), a másik 4 nehézfém kontroll csoportjának VCL-je nem mutatott szignifikáns csökkenést a kísérlet alatt. Akárcsak a PMOT esetében, az expozíciós időnek (Ni²⁺: p=0,0173; Cr³⁺: p=0,0028; minden más esetben p<0,0001) és a koncentrációnak is (p<0,0001 minden esetben) szignifikáns hatása volt a VCL-re minden nehézfém-kezelés során. A Cr³⁺ és a Ni²⁺ kivételével, minden kezelés során szignifikáns interakció mutatkozott a két vizsgált változó között (p<0,0001).



27. ábra: A zebradánió-spermiumok átlagos sebessége (VCL, $\mu m/s$) szórással ($n=5$) különböző koncentrációjú nehézfém-oldatoknak történő kitettség esetén, az expozíciós idő minden 30. percében. Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$, **** $p<0,0001$).

A kezelt minták VCL értékeit vizsgálva is megfigyelhető a dózis-hatás reakció a legtöbb nehézfém esetében, ahogy a PMOT értékek vizsgálata során is, bár a Ni^{2+} hatása nem egyértelmű: a dózis növelésével a kiváltott hatás nem nő párhuzamosan, a legnagyobb, 1200 mg/L-es koncentráció esetében a VCL értékek ingadozása figyelhető meg. A Zn^{2+} és a Cd^{2+} vizsgálata során ugyanúgy nem jelentkezett még a VCL-re kifejtett hatás az expozíció 30. percében, mint a PMOT esetében. A Cr^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , As^{3+} , valamint a Ni^{2+} vizsgálata során már 30 perc kitettség után

megfigyelhető a VCL értékének szignifikáns csökkenése, ahogyan a PMOT esetében is. Minden egyes nehézfém-kezelésről elmondható azonban, hogy a VCL értékek csökkenése nem volt annyira kifejezett, mint a PMOT esetében: a görbék lefutása nem volt annyira meredek ezen paraméter vizsgálata során.

A különböző nehézfémek hatását vizsgálva megállapítható, hogy kevesebb esetben csökkent a VCL értéke 50%-os mértékben, viszont azoknál a mérési időpontoknál, ahol lehetőség volt az EC₅₀-értékek megállapítására, alacsonyabb értékek figyelhetők meg a legtöbb nehézfém esetében (Cu²⁺, Cd²⁺, As³⁺ és Zn²⁺), mint a PMOT-ban. Egyedül a Cr³⁺ és Hg²⁺ esetében tapasztalható (utóbbinál a 30. és 60. perc kivételével), illetve a többi nehézfém-kitettséggel 240. percében, hogy a VCL esetében magasabb EC₅₀-értékek tapasztalhatóak, mint a PMOT-ban: itt a PMOT érzékenyebben reagált. A Zn²⁺ és a Ni²⁺ esetében viszont csak egy-egy mérési időpont volt, melynél a VCL a kontroll-érték felére csökkent (240 és 120 perc, 9. táblázat)

9. táblázat: A zebradánió-sperma sebességére (VCL) vonatkoztatott EC₅₀-értékek (mg/L) különböző nehézfémeknek történő kitettséggel esetén, az expozíció minden 30. percében (ahol becsülhető). A pontyban kapott EC₅₀-értékekhez viszonyított különbséget csillag jelöli (***) p<0,001, **** p<0,0001).

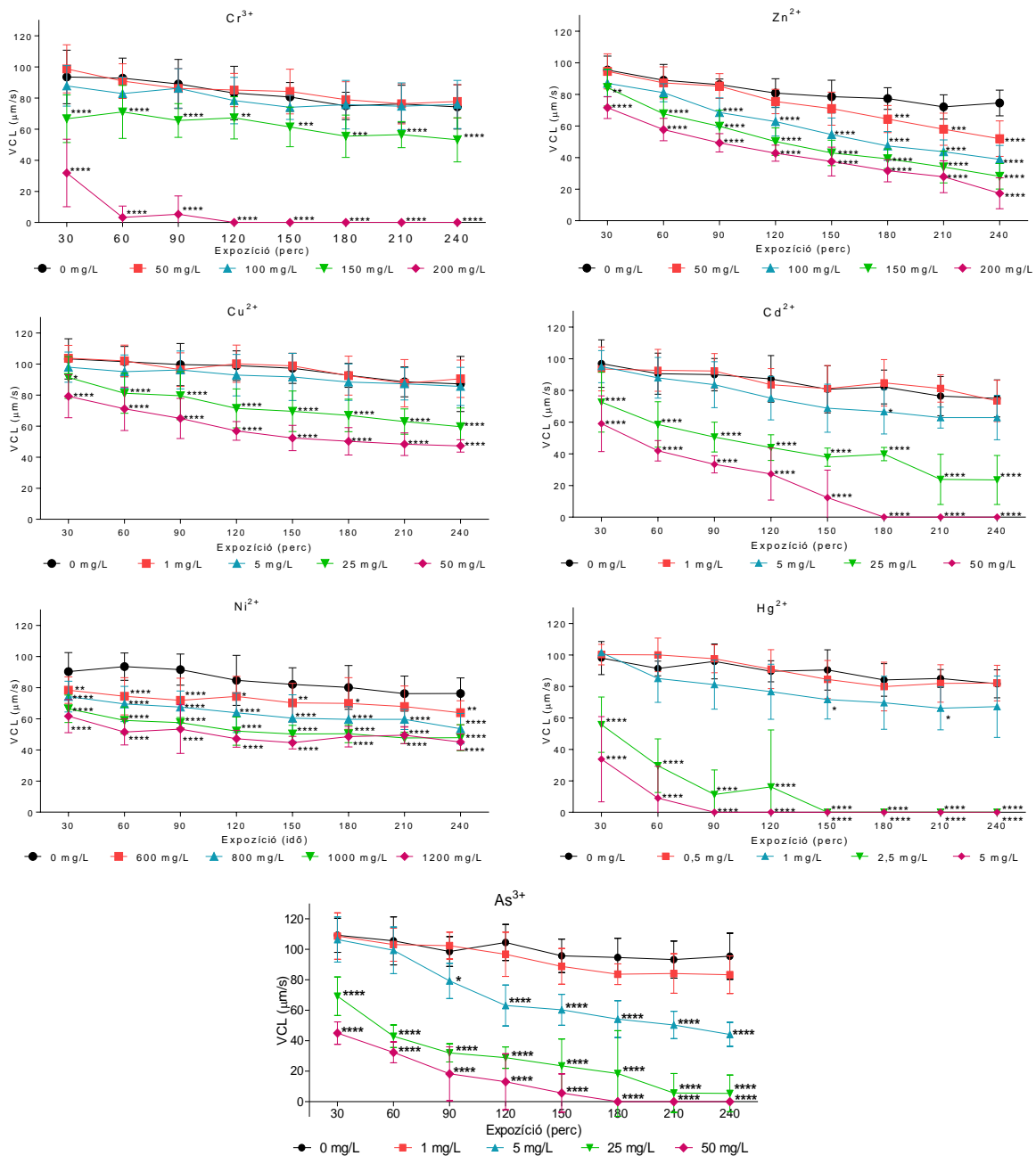
Expozíciós idő (perc)	Cr ³⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺ (mg/L)	Ni ²⁺	As ³⁺	Hg ²⁺
30	156						2,5
60	156					69****	2,2
90	155					51****	2,0
120	155				548***	44****	1,9
150	143		11****	25		42****	1,4
180	155		9****	16		33****	1,2
210	147		11****	12		29****	1,2
240	155	52****	17****	11***		34****	1,3

4.1.2.2 Ponty

A frissen lefejt pontysperma VCL értéke $105 \pm 10 \mu\text{m/s}$ (n=35) volt. A nehézfém kezelések hatására ez esetben is megfigyelhető volt a dózis-hatás összefüggés (28. ábra). A kontroll pontysperma-minták VCL értéke csak 3 nehézfém-kezelés mellett változott szignifikánsan az expozíció 30. és 240. perce között (Cd²⁺, Hg²⁺, Zn²⁺: p=0,0046 és 0,0328 között, n=5), míg a másik 4 nehézfém mellett nem volt megfigyelhető szignifikáns változás. Az expozíciós idő és a koncentráció hatása minden nehézfém-kezelés során szignifikáns volt (p<0,0001 minden esetben). Minden esetben szignifikáns interakció volt megfigyelhető a vizsgált változók között (Cr³⁺: p=0,0008; Cu²⁺: p=0,0001; minden más esetben p<0,0001).

A kezelt mintákban a koncentráció növelésével párhuzamosan nőtt a toxikus anyagok hatása; ez még a Ni²⁺ VCL-re kifejtett hatásában is jól látszik a ponty esetében, nem úgy, mint

zebradánióban, ahol az 1200 mg/L-es koncentráció mellett a VCL értékek ingadozása volt megfigyelhető az expozíciós idő előrehaladtával. A pontyban mért PMOT értékekkel megegyezően, a VCL értékében is már az expozíció 30. percében megnyilvánult a nehézfémek toxikus hatása minden kezelés esetében. Azonban itt is elmondható, akár csak a zebradánió esetében, hogy a VCL-ben mért változások görbéinek lefutása nem annyira meredek, mint a PMOT-ban: kisebb mértékű hatás jelentkezett ebben a paraméterben a nehézfém-kitettséget követően.



28. ábra: A pontyspermiumok átlagos sebessége (VCL, $\mu\text{m/s}$) szórással ($n=5$) különböző koncentrációjú nehézfém-oldatoknak történő kitettség esetén, az expozíciós idő minden 30. percében. Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

A zebradánió VCL értékeivel összehasonlítva azonban azt látjuk, hogy a pontysperma sebessége a kitettség kezdeti fázisában érzékenyebben reagált a kezelésre: míg a Zn^{2+} és a Cd^{2+} vizsgálata során az expozíció 30. percében még nem volt megfigyelhető változás a zebradánió-sperma VCL értékében, addig ponty esetében a VCL már a 30. percen szignifikáns csökkenést mutatott a kontrollhoz viszonyítva. A pontysperma VCL értékének változását bemutató grafikonokon viszont látszik, hogy a hét vizsgált nehézfémről csupán öt esetében csökkent a VCL értéke a kontroll csoportban mért felére a 4 órás expozíciós idő alatt; a Ni^{2+} és a Cu^{2+} vizsgálata során a szennyezőanyag hatására bekövetkező csökkenés mértéke nem érte el az 50%-t. Ezzel szemben míg a Zn^{2+} -kezelés hatására a zebradánió-spermában csak a kitettség 240. percében volt lehetőség EC_{50} -érték számítására, addig a pontyspermában már a 150. percnél megjelenik a VCL értékének ilyen arányú csökkenése (10. táblázat). Összességében azonban elmondható ugyanaz, mint a zebradánió-sperma VCL értékeiről: annak ellenére, hogy kisebb mértékű csökkenés jelenik meg ezen a vizsgálati paraméteren, az EC_{50} -értékek alacsonyabbak a legtöbb esetben. A Zn^{2+} esetében ugyan kevesebb expozíciós időpont mellett lehetett EC_{50} -értékeket számolni, ám ezek a PMOT-ban mérteknél alacsonyabbnak bizonyultak, mint ahogy a Hg^{2+} , Cd^{2+} és As^{3+} esetében az expozíció kezdetén (60., 120., valamint 150. percig). Az expozíció előrehaladtával viszont a PMOT esetén alacsonyabb EC_{50} -értékek figyelhetőek meg, mint a VCL-ben. A Cr^{3+} vizsgálata során kapott EC_{50} -értékek viszont – akár csak a zebradánió esetében – a PMOT-ban bizonyultak érzékenyebbnek az expozíció teljes időtartama alatt.

10. táblázat: A pontysperma sebességére (VCL) vonatkoztatott EC_{50} -értékek (mg/L) különböző nehézfémeknek történő kitettség esetén, az expozíció minden 30. percében (ahol becsülhető). A zebradánióban kapott EC_{50} -értékekhez viszonyított különbséget csillag jelöli (***) $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Expozíciós idő (perc)	Cr^{3+}	Zn^{2+}	Cu^{2+}	Cd^{2+} (mg/L)	Ni^{2+}	As^{3+}	Hg^{2+}
30	148					25****	2,4
60	156			17****		12****	1,7
90	154			14****		9****	1,5
120	156			12****		6****	1,6
150	155	86****		15		7****	1,2
180	154	74****		16		6****	1,3
210	154	72****		12		5****	1,2
240	154	66****		14***		4****	1,1

A két fajban kapott, VCL-re vonatkozó EC_{50} -értékeket összehasonlítva megállapítható, hogy kevesebb esetben különböztek egymástól szignifikánsan, mint a PMOT-ban kapott értékek összehasonlítása során. A Hg^{2+} és Cr^{3+} esetében a két halfaj érzékenysége között nem mutatkozott szignifikáns különbség. Egyedül az As^{3+} esetében tapasztalható, hogy a ponty érzékenyebben

reagált: e nehézfém esetében minden mérési időpontban szignifikánsan alacsonyabb EC_{50} -értékeket mértem pontyban, mint zebraadánióban, amit a tesztelt koncentrációk teljesen különböző tartománya indokol a két fajban. A Zn^{2+} , valamint a Cd^{2+} 240. expozíciós percében a zebraadánió VCL-értékei bizonyultak érzékenyebbek. Továbbá e két nehézfém esetében több expozíciós időpontban lehetett ezen értékeket kiszámolni zebraadánióban, mint pontyban, ami szintén jól mutatja, hogy a zebraadánió-sperma érzékenyebben reagált e két nehézfémre.

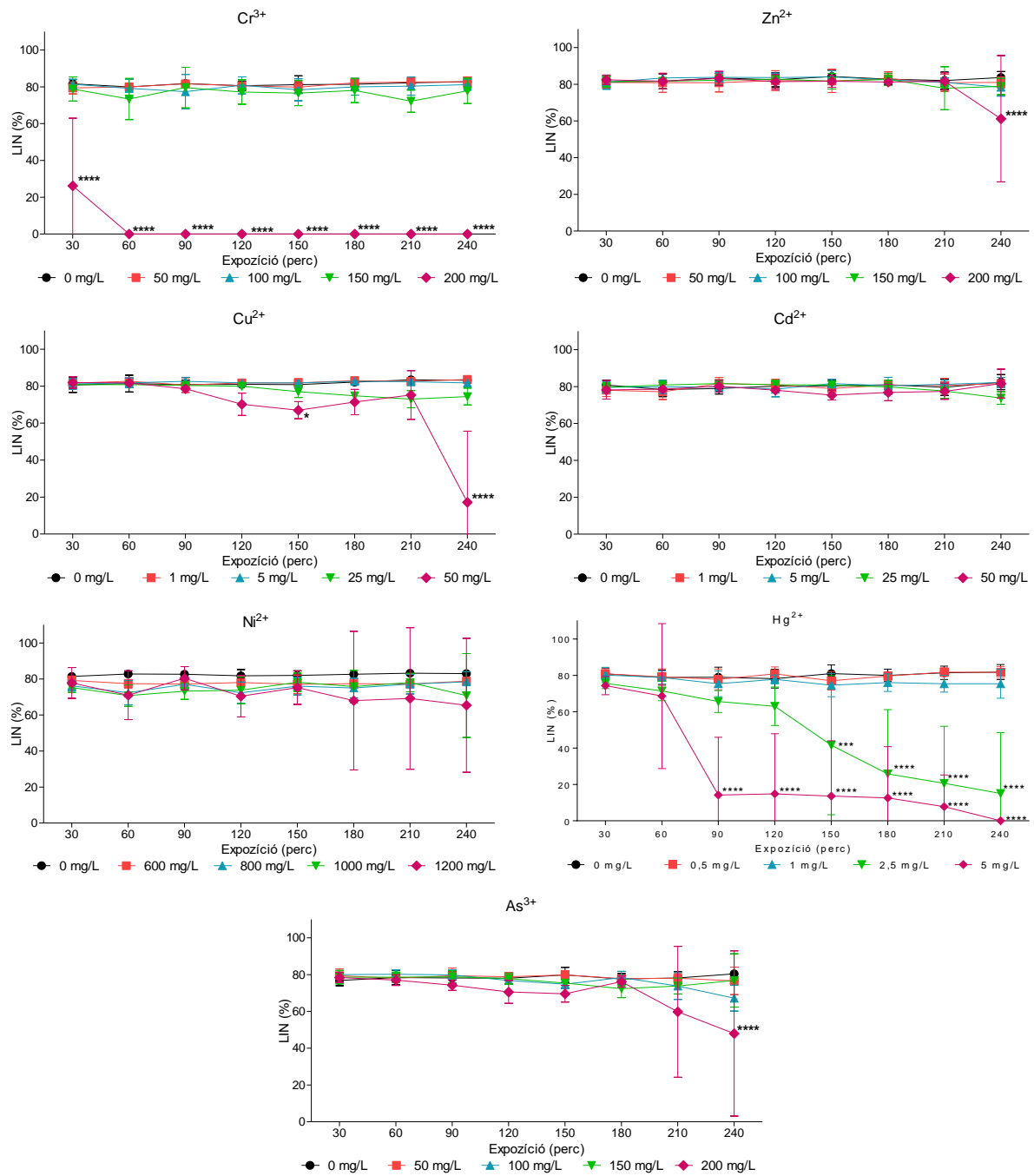
4.1.3 A nehézfémek spermiumok mozgásának az egyenestől való eltérésére (LIN) gyakorolt hatása

4.1.3.1 Zebraadánió

A zebraadánió-spermiumok nehézfém-kezelések előtti LIN értéke $78 \pm 4\%$ ($n=35$) volt. A nehézfém-kitettség hatását ezen a vizsgált paraméteren a 29. ábra szemlélteti. A kontroll minták LIN értékei nem mutattak szignifikáns csökkenést egyik nehézfém-kezelés mellett sem, az expozíciós idő előre haladtával. Az expozíciós időnek a Cd^{2+} kivételével minden esetben szignifikáns hatása volt (As^{3+} : $p=0,0218$; Cr^{3+} : $p=0,0491$; minden más esetben $p<0,0001$). Ezzel szemben a koncentrációnak csupán 4 nehézfém vizsgálata során volt szignifikáns hatása (As^{3+} : $p=0,0299$; Cr^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} : $p<0,0001$ mindhárom esetben). A vizsgált változók között 4 nehézfém-kezelés során volt megfigyelhető szignifikáns interakció (Cr^{3+} : $p=0,0061$; Cd^{2+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} : $p<0,0001$ mindhárom esetben).

A diagramokat tekintve jól látszik, hogy csak a Hg^{2+} esetében jelent meg a klasszikus dózis-hatás reakció, miszerint a koncentráció növelésével a toxikus hatás mértéke növekedett. A Cr^{3+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} és As^{3+} vizsgálata során csak a legmagasabb koncentráció okozott szignifikáns csökkenést ezen a paraméteren. A Cu^{2+} esetében ráadásul csak az expozíciós idő 150., valamint 240. percében jelent meg szignifikáns változás. A Cd^{2+} , valamint a Ni^{2+} -expozíció hatására pedig nem következett be változás a LIN értékében a 4 órás expozíciós idő alatt.

A Hg^{2+} esetében tapasztaltakat összehasonlítva a másik két motilitási paraméterrel megállapítható, hogy míg a zebraadánió PMOT és VCL értékén a kitettség hatására jelentkező csökkenés már a kezelés 30. percében elérte az 50%-ot, addig a LIN értékében ilyen mértékű változás csak a 90. perc után következett be (11. táblázat). A másik két motilitási paraméterben kapott EC_{50} -értékekhez viszonyítva megállapítható, hogy a LIN bizonyult a legkevésbé érzékenynek: a számított értékek itt voltak a legmagasabbak minden mérési időpontban.



29. ábra: A zebradánió-spermiumok mozgásának az egyenestől való átlagos eltérése (LIN, %) szórással (n=5) különböző koncentrációjú nehézfém-oldatoknak történő kitettség esetén, az expozíciós idő minden 30. percében. Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (* p<0,05, *** p<0,001, **** p<0,0001).

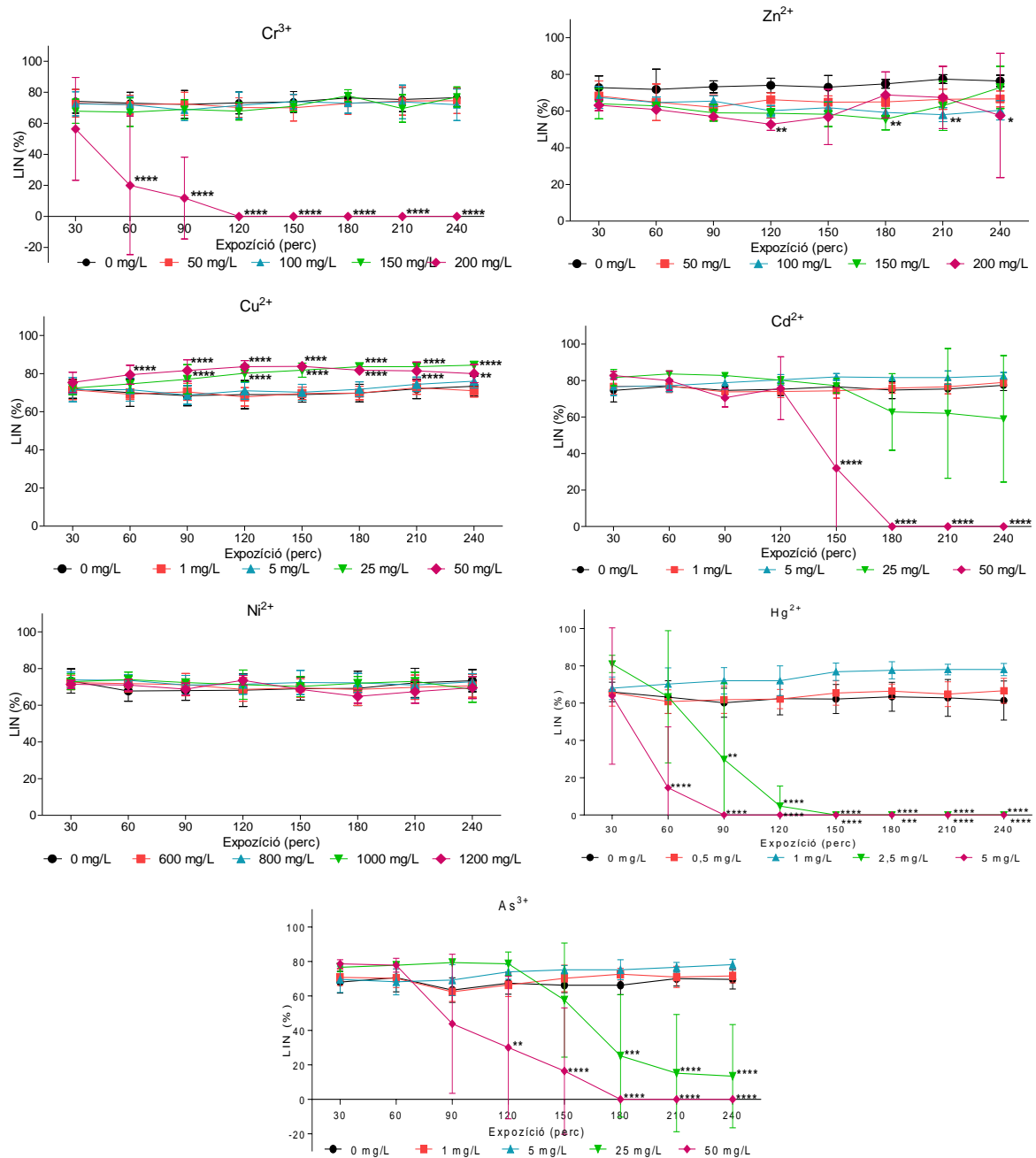
11. táblázat: A zebradánió-spermiumok mozgásának egyenességére (LIN) vonatkoztatott EC₅₀-értékek (mg/L) különböző nehézfémeknek történő kitétség esetén (ahol becsülhető), az expozíció minden 30. percében.

Expozíciós idő (perc)	Cr ³⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺ (mg/L)	Ni ²⁺	As ³⁺	Hg ²⁺
30							
60							
90							2,8
120							2,7
150							2,3
180							1,9
210							1,8
240							1,8

4.1.3.2 Ponty

A pontysperma nehézfém-kitétséget megelőző LIN értéke $68 \pm 6\%$ (n=35) volt. A nehézfém-kezelések hatása az 30. ábrán látható. Egyik nehézfém-kezelés mellett sem volt megfigyelhető szignifikáns változás a kontroll pontysperma-minták LIN értékében a 4 órás expozíciós idő során. Az expozíciós idő hatása 5 nehézfém, a As³⁺, Cd²⁺, Cr²⁺, Cu²⁺ és Hg²⁺ vizsgálata során bizonyult szignifikánsnak ($p < 0,0001$ minden esetben). Ezen nehézfémek, valamint a Zn²⁺ esetében szignifikáns hatása volt a koncentrációnak is ($p < 0,0001$ minden esetben). Az előbb említett 5 nehézfém-kezelés során szignifikáns interakció volt tapasztalható a vizsgált változók között is ($p < 0,0001$ minden esetben).

A zebradánióval szemben azonban – ahol csak a Hg²⁺ vizsgálata során volt megfigyelhető dózis-hatás összefüggés ezen a paraméteren –, az As³⁺ és a Cu²⁺ esetében is dózis-hatás volt tapasztalható a pontysperma LIN értékében. A Cu²⁺ hatására viszont nem csökkenő dózis-hatás jelentkezett: a koncentráció növelésével párhuzamosan a LIN értékének növekedése volt megfigyelhető. A Zn²⁺ esetében ugyan látható a kontrollhoz viszonyított szignifikáns különbség, azonban a LIN értékének ingadozása figyelhető meg a 150 és 200 mg/L-es koncentrációk hatására: a kezdeti csökkenés után növekedés következik be. A Cr³⁺ és Cd²⁺ vizsgálata során csak a legmagasabb koncentrációk okoztak szignifikáns csökkenést a kontrollhoz viszonyítva, a Ni²⁺ esetében pedig – akárcsak a zebradánió-spermán – nem volt tapasztalható változás a LIN értékében.



30. ábra: A pontyspermiumok mozgásának az egyenestől való átlagos eltérése (LIN, %) szórással (n=5) különböző koncentrációjú nehézfém-oldatoknak történő kitettség esetén, az expozíciós idő minden 30. percében. Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ****p<0,0001).

Az As³⁺ és Hg²⁺ vizsgálata során tapasztalható dózis-hatás összefüggést szemlélve elmondható, hogy míg pontyban már az expozíció 60. percétől megfigyelhető a kontrollhoz viszonyított 50%-os csökkenés, addig ugyanez zebraadánió spermán csak a 90. percétől következett be a Hg²⁺-expozíció hatására. Az As³⁺-kitettség során pedig csak a 120. percétől volt lehetséges az EC₅₀-értékek számítása, habár zebraadánió esetében nem jelent meg dózis-hatás ezen a paraméteren (12. táblázat). Ponty esetében is elmondható ugyanaz, mint zebraadánióban: amellet, hogy ezen paraméter esetében lehetett a legkevesebb esetben EC₅₀-értékeket számítani, ezek minden

expozíciós időpontban a legkevésbé érzékenynek bizonyultak a másik két motilitási paraméterhez viszonyítva.

12. táblázat: A ponty spermiumok mozgásának egyenességére (LIN) vonatkoztatott EC₅₀-értékek (mg/L) különböző nehézfémeknek történő kitettség esetén (ahol becsülhető), az expozíció minden 30. percében. A zebraadánióban kapott EC₅₀-értékekhez viszonyított különbséget csillag jelöli (**** p<0,0001).

Expozíciós idő (perc)	Cr ³⁺	Zn ²⁺	Cu ²⁺	Cd ²⁺ (mg/L)	Ni ²⁺	As ³⁺	Hg ²⁺
30							
60							2,7****
90							2,5
120						35****	2,2
150						26****	1,6
180						25****	1,6
210						24****	1,6
240						24****	1,6

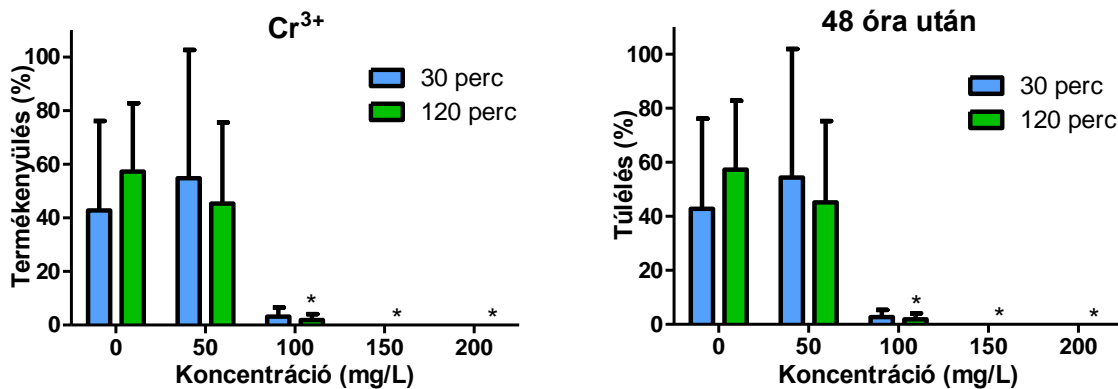
A két fajban kapott, LIN-re vonatkozó EC₅₀-értékeket összehasonlítva megállapítható, hogy az As³⁺ esetében az okozza minden mérési időpontban a szignifikáns különbséget, hogy zebraadánióban nem volt lehetséges ezen értékek megállapítása a LIN értékének csupán minimális csökkenése miatt. Hg²⁺ esetében az expozíciós idő 60. percénél jelentkező szignifikáns különbséget szintén az okozza, hogy zebraadánióban nem lehetett ezen mérési időpontban EC₅₀-értéket számítani.

4.2 A termékenyülés és az embriogenezis vizsgálata

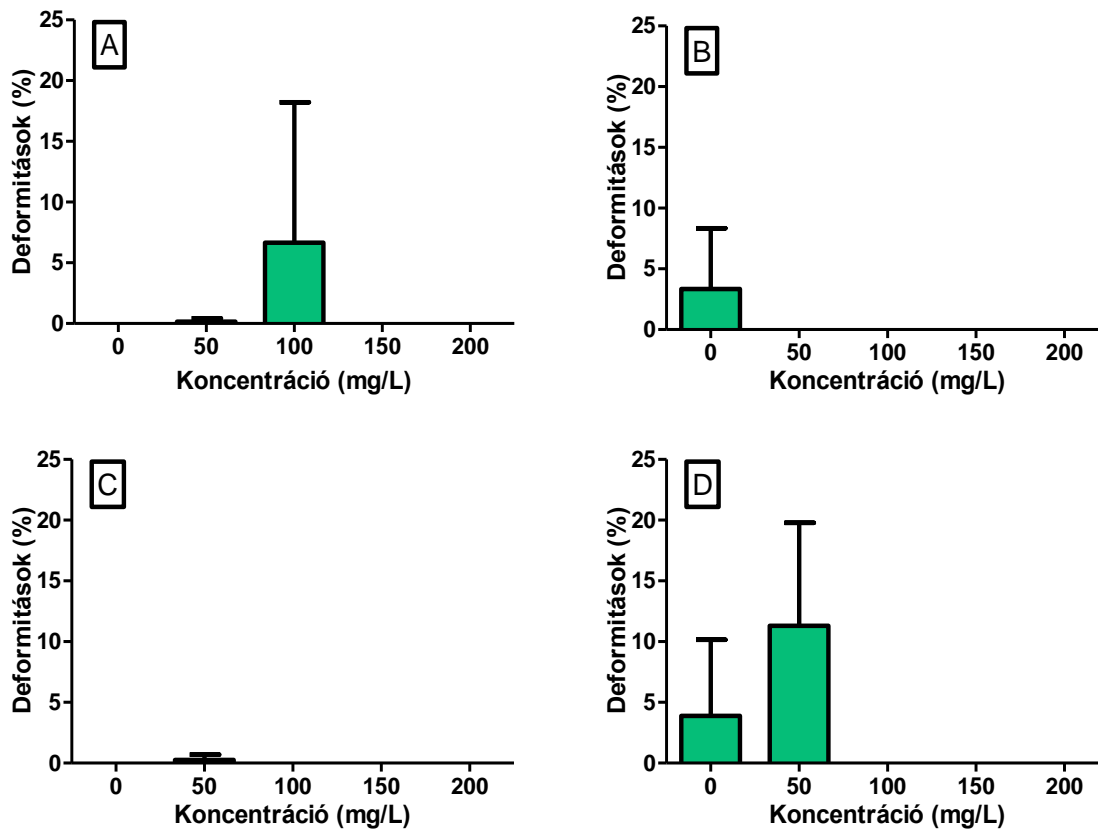
4.2.1 Króm

A Cr³⁺ vizsgálata során a friss zebraadánió-sperma PMOT értéke $67 \pm 10\%$ (n=3) volt a 30 perces expozíciót alkalmazó kísérletekben, míg $63 \pm 5\%$ (n=3) a 120 perces kitettséget vizsgáló tesztekben, melyek különbsége statisztikailag nem szignifikáns. E nehézfém esetében megállapítható, hogy a sperma expozíciós ideje nem volt hatással a termékenyülési százalékra, azonban a koncentráció hatása szignifikáns (p=0,0044). A sperma 50 mg/L Cr³⁺-expozíciója vizsgálata során még nem volt megfigyelhető hatás, azonban 100 mg/L expozíció szignifikánsan csökkentette az ikra termékenyülési százalékát, 150 és 200 mg/L Cr³⁺ alkalmazása pedig a termékenyülés teljes gátlásához vezetett a sperma 120 perces kitettsége esetében (31. ábra). Szignifikáns különbség azonban csak a sperma 120 percig tartó Cr³⁺-kitettség hatására volt megfigyelhető, a 30 perces kitettség hatása nem bizonyult szignifikánsnak. A sperma 120 perces kitettsége esetében a termékenyülésre vonatkoztatott EC₅₀-érték 67 mg/L, mely azonban

szignifikánsan alacsonyabb, mint a PMOT-ban és a VCL-ben azonos időpontban kapott EC_{50} -értékek ($p < 0,0001$). Az embriók 48 órás életkorban vizsgált, termékenyült ikrák számához viszonyított túlélését vizsgálva megállapítható, hogy egyik koncentráció vizsgálata során sem fordult elő a kontrollhoz viszonyított szignifikáns különbség. Az embrionális torzulások kialakulásának százalékát tekintve elmondható, hogy a sperma 30 és 120 perces expozíciója nem okozott szignifikáns eltérést a kontroll csoporthoz képest 24 és 48 óra után sem (32. ábra).



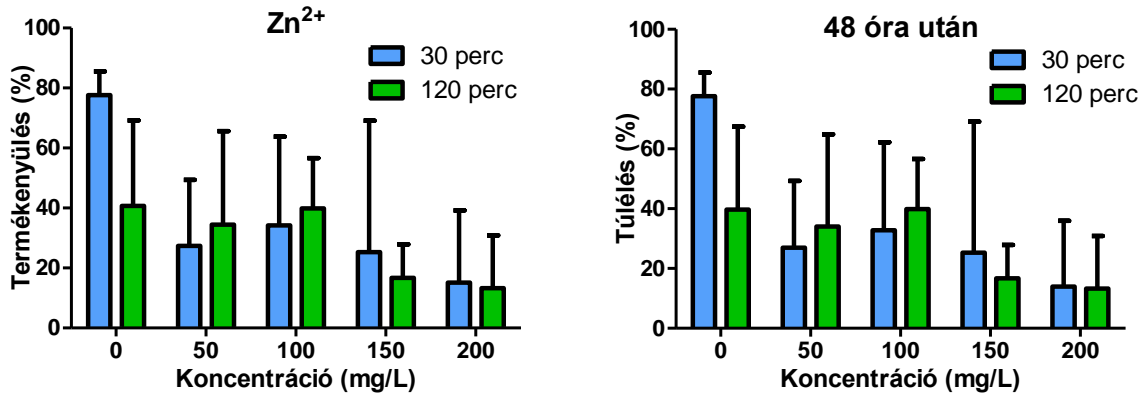
31. ábra: A zebradánió-sperma különböző koncentrációjú Cr^{3+} -kitettségeinek hatása a termékenyülési százalékra, valamint az embriók 48 órás korban vizsgált túlélésére (%), szórással, $n=3$). A különböző színű oszlopok a sperma különböző expozíciós idejű Cr^{3+} -kitettségét jelölik (kék: 30 perces expozíció, zöld: 120 perces expozíció). Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (* $p < 0,05$).



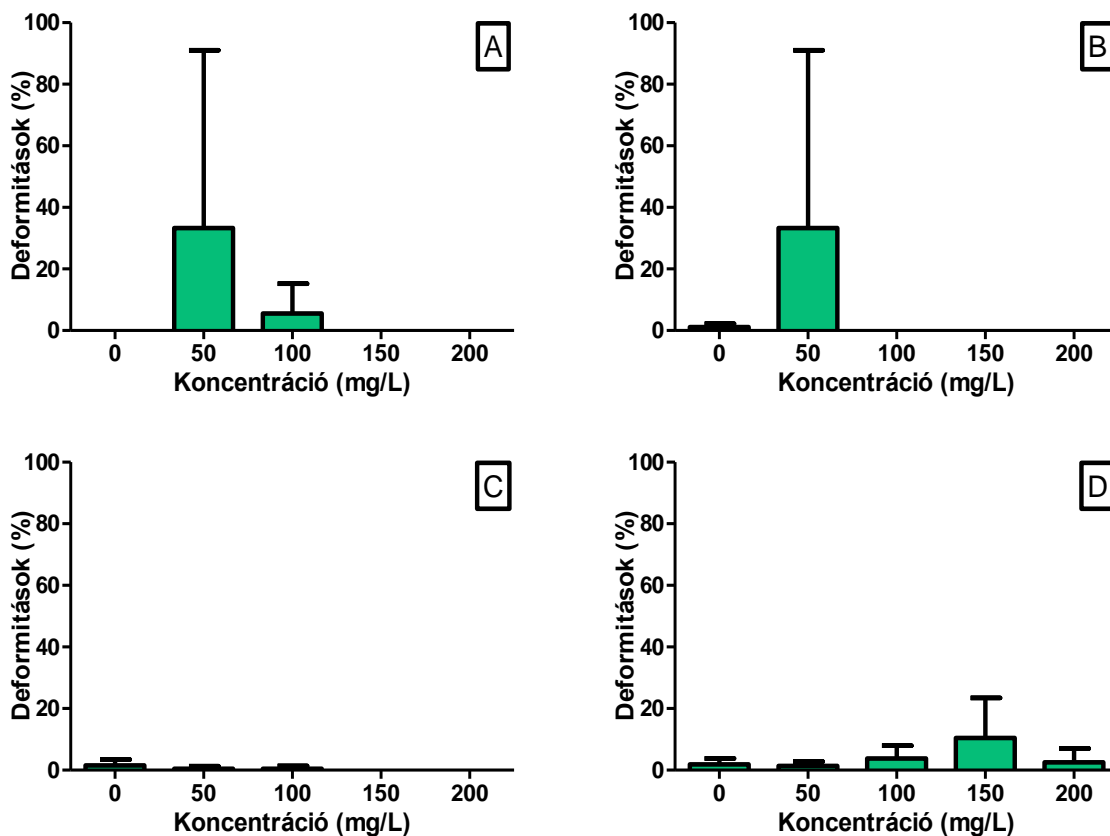
32. ábra: Embrionális deformitások kialakulásának aránya (%), szórással, $n=3$) a zebradánió-sperma különböző koncentrációjú Cr^{3+} -kitettséget követően, különböző expozíciós idők mellett, különböző embrionális életkorokban. **A:** a sperma 30 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **B:** a sperma 30 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban, **C:** a sperma 120 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **D:** a sperma 120 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban.

4.2.2 Cink

A Zn^{2+} vizsgálata során a friss sperma PMOT értéke $72 \pm 5\%$ ($n=3$) volt a sperma 30 perces kitettséget vizsgáló kísérletekben, míg $61 \pm 4\%$ -ot ($n=3$) a 120 perces expozíció vizsgálata során. Bár ezen értékek között statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott ($p=0,0316$), ennek ellenére sem az expozíciós idő, sem a toxikus anyag koncentrációja nem volt szignifikáns hatással a termékenyülésre és az embriók 48 órás túlélésére (33. ábra). Az embrionális torzulások kialakulásának aránya sem volt szignifikáns egyik alkalmazott expozíciós idő mellett, valamint egyik vizsgált embrionális életkorban sem (34. ábra).



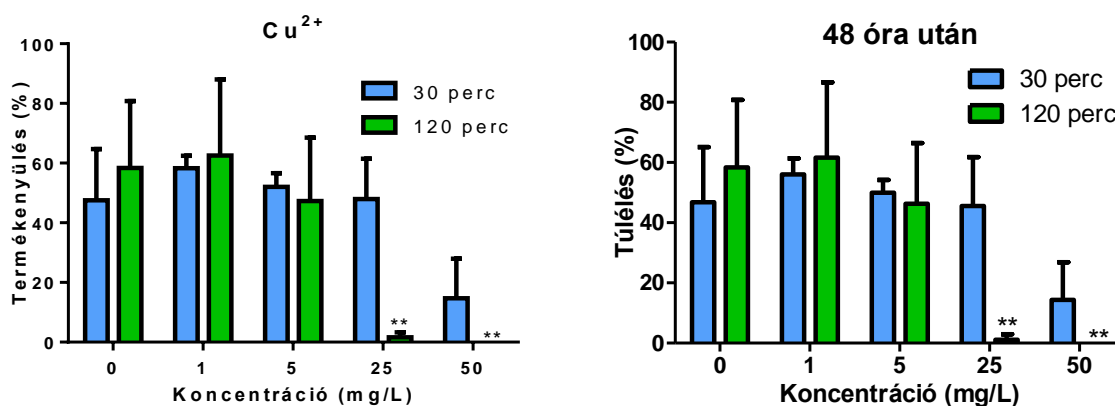
33. ábra: A zebradánió-sperma különböző koncentrációjú Zn²⁺-kitettségének hatása a termékenyülési százalékra, valamint a fejlődő embriók 48 órás túlélésére (% , szórással, n=3). A különböző színű oszlopok a sperma különböző expozíciós idejű Zn²⁺-kitettségét jelölik (kék: 30 perces expozíció, zöld: 120 perces expozíció).



34. ábra: Embrionális deformitások kialakulásának aránya (% , szórással, n=3) a zebradánió-sperma különböző koncentrációjú Zn²⁺-kitettségét követően, különböző expozíciós idők mellett, különböző embrionális életkorokban. **A**: a sperma 30 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **B**: a sperma 30 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban, **C**: a sperma 120 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **D**: a sperma 120 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban.

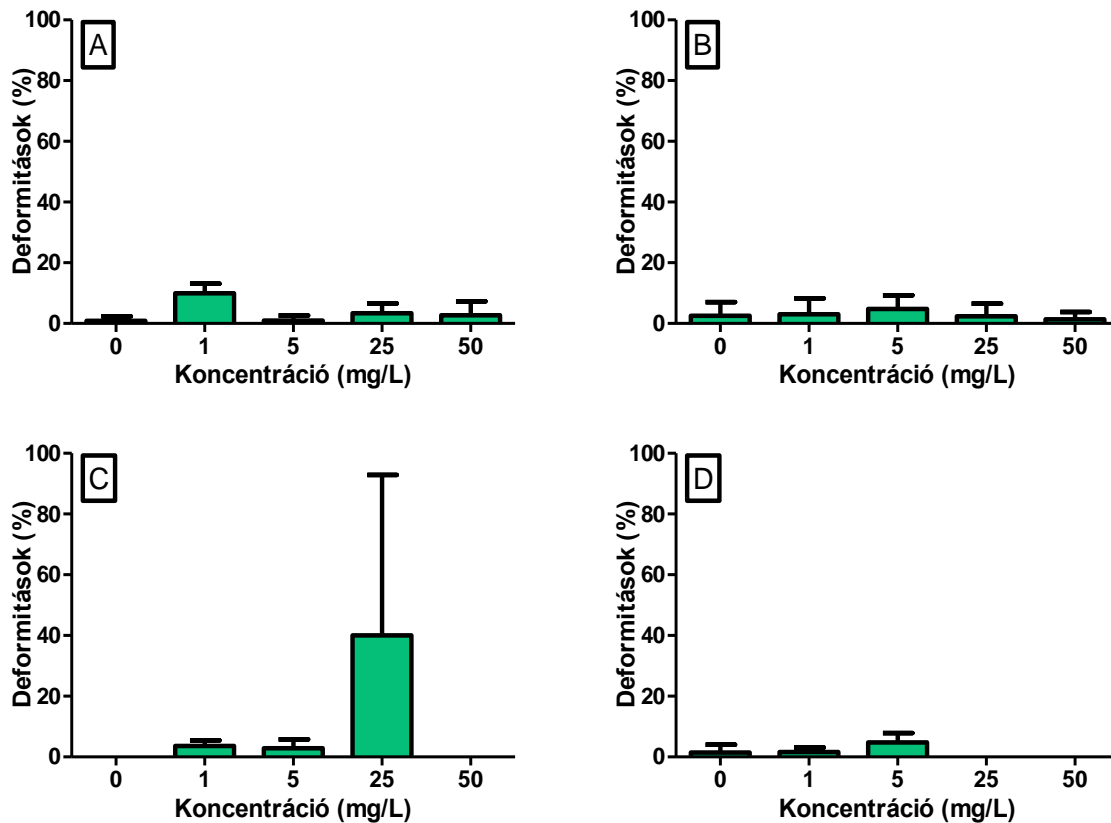
4.2.3 Réz

A Cu^{2+} esetében a friss sperma PMOT értéke $71 \pm 2\%$ ($n=3$) volt a 30 perces kitettséget vizsgáló tesztekben, míg $68 \pm 1\%$ ($n=3$) a 120 perces expozíciót vizsgáló kísérletekben. Habár ezen értékek statisztikailag különböznek egymástól ($p=0,0298$), ennek ellenére elmondható, hogy akárcsak a Cr^{3+} -nál, a sperma expozíciós idejének nem volt szignifikáns hatása a termékenyülésre. A Cu^{2+} koncentrációjának ugyanakkor szignifikáns hatása volt a termékenyülési értékekre ($p=0,0002$). A sperma 30 perces kitettsége még nem okozta a vizsgált paraméter szignifikáns csökkenését, azonban a sperma 120 perces expozíciója esetén már 25 mg/L koncentráció mellett megfigyelhető ezen értékek csökkenése (35. ábra). A sperma 30 perces kitettsége során a termékenyülésre vonatkoztatott EC_{50} -érték 26 mg/L, míg a sperma 120 percig tartó expozíciója esetében 10 mg/L, mely utóbbi a PMOT-ban kapottól nem, viszont a VCL-től szignifikánsan különbözik ($p<0,0001$). Az embriók 48 órás korban vizsgált túlélése esetén nem mutatkozott a kontrollhoz viszonyított szignifikáns különbség egyik koncentráció esetében sem. Az embrionális deformitások kialakulásának aránya egyik expozíciós idő mellett, valamint egyik vizsgált embrionális életkorban sem volt szignifikánsan eltérő a kontrollhoz képest (36. ábra).



35. ábra: A zebradánió-sperma különböző koncentrációjú Cu^{2+} -kitettségeinek hatása a termékenyülési százalékra, valamint a fejlődő embriók 48 órás túlélésére (% , szórással, $n=3$).

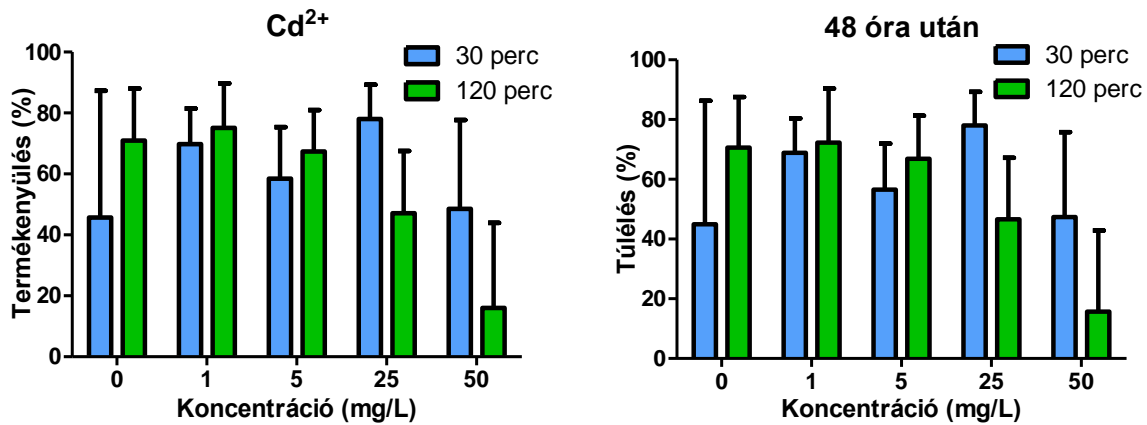
A különböző színű oszlopok a sperma különböző expozíciós idejű Cu^{2+} -kitettséget jelölik (kék: 30 perces expozíció, zöld: 120 perces expozíció). Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (** $p<0,01$).



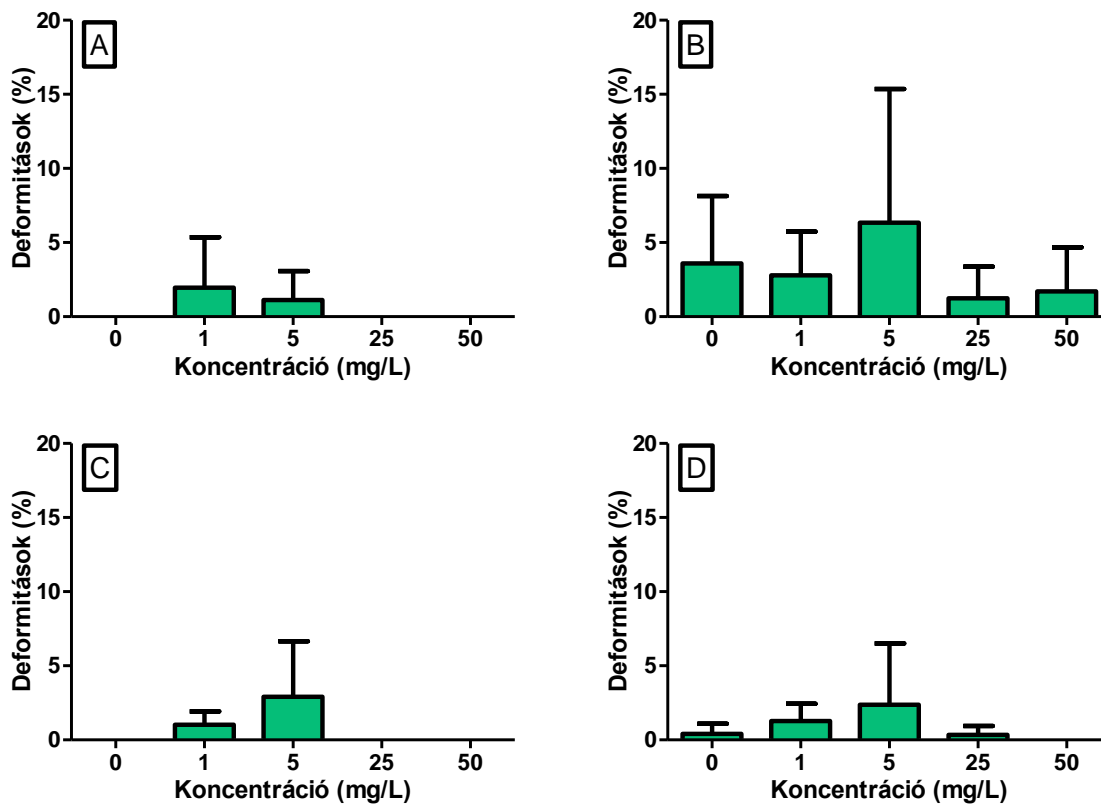
36. ábra: Embrionális deformitások kialakulásának aránya (%), szórással, $n=3$) a zebradánio-sperma különböző koncentrációjú Cu^{2+} -kitettséget követően, különböző expozíciós idők mellett, különböző embrionális életkorokban. **A:** a sperma 30 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **B:** a sperma 30 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban, **C:** a sperma 120 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **D:** a sperma 120 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban.

4.2.4 Kadmium

A Cd^{2+} hatásának vizsgálata során a frissen nyert sperma PMOT értéke $70 \pm 4\%$ ($n=3$) volt a sperma 30 perces kitettséget vizsgáló kísérletekben, valamint $72 \pm 4\%$ ($n=3$) a 120 perces expozíciót vizsgáló tesztekben, melyek statisztikailag megegyeznek. Ezen nehézfém a Zn^{2+} -hez hasonló eredményt mutatott: sem a termékenyülési százaléokra, sem az embriók 48 órás túlélésére nem volt hatással a sperma 30, valamint 120 perces Cd^{2+} -expozíciója (39. ábra). Mindamelllett az embrionális torzulások kialakulásának aránya sem különbözött szignifikánsan a kontroll csoporttól egyik expozíciós idő mellett, valamint egyik vizsgált embrionális életkorban sem (40. ábra).



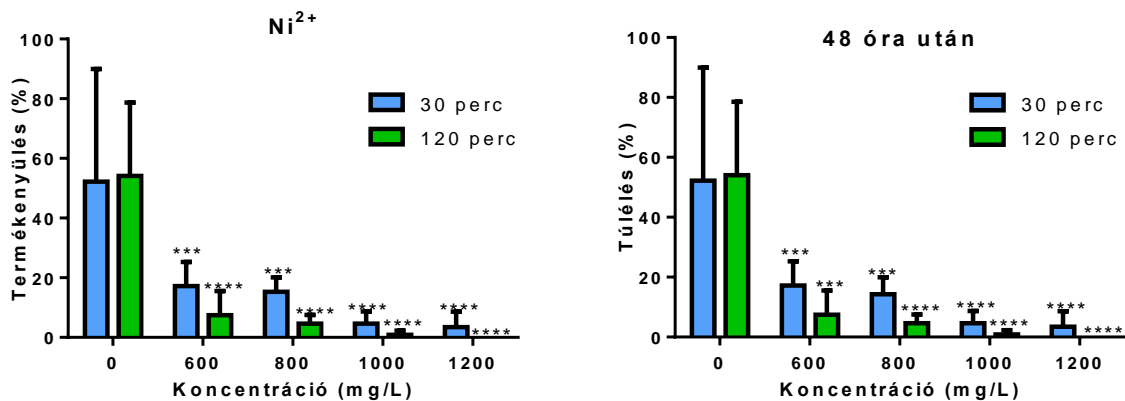
39. ábra: A zebradánió-sperma különböző koncentrációjú Cd²⁺-kitettségének hatása a termékenyülési százalékra, valamint a fejlődő embriók 48 órás túlélésére (% , szórással, n=3). A különböző színű oszlopok a sperma különböző expozíciós idejű Cd²⁺-kitettségét jelölik (kék: 30 perces expozíció, zöld: 120 perces expozíció).



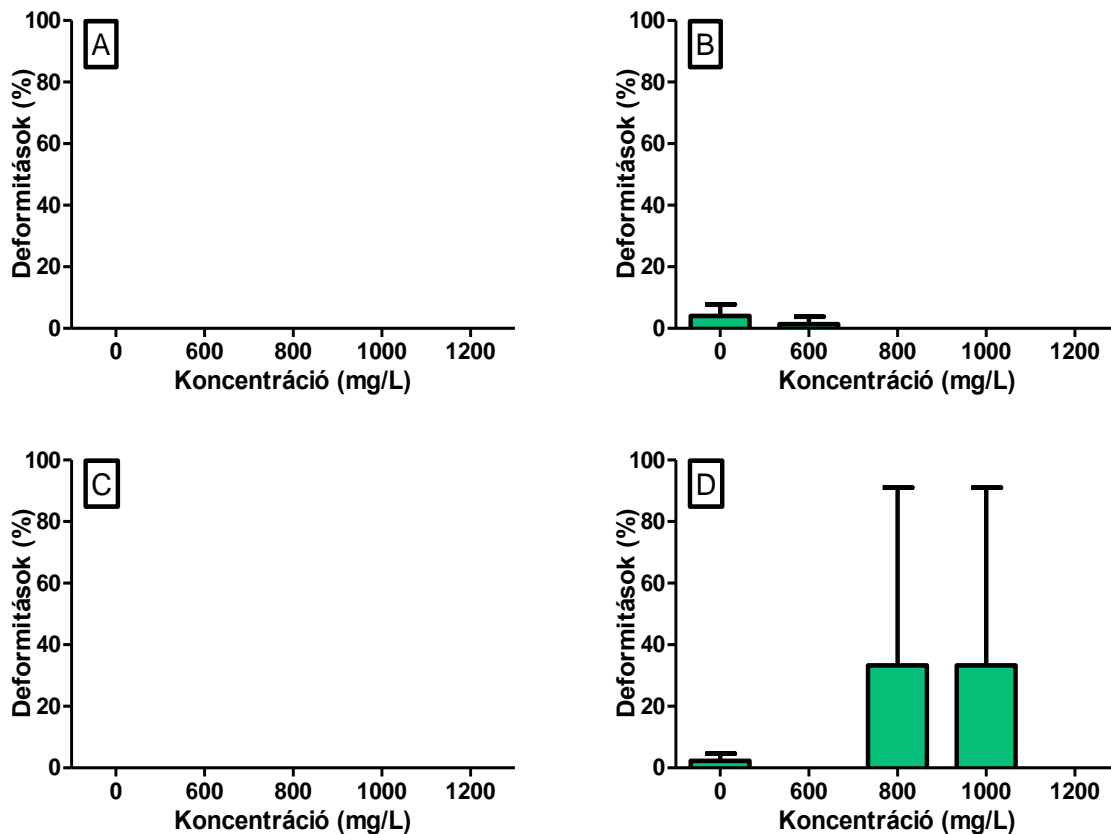
40. ábra: Embriónális deformitások kialakulásának aránya (% , szórással, n=3) a zebradánió-sperma különböző koncentrációjú Cd²⁺-kitettségét követően, különböző expozíciós idők mellett, különböző embriónális életkorokban. **A**: a sperma 30 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **B**: a sperma 30 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban, **C**: a sperma 120 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **D**: a sperma 120 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban.

4.2.5 Nikkel

A Ni^{2+} esetében a friss zebra-dánió-sperma $73 \pm 10\%$ PMOT értékkel ($n=3$) rendelkezett a 30 perces expozíció hatását vizsgáló kísérletekben, míg $70 \pm 9\%$ -kal ($n=3$) a 120 perces kitettséget tesztelő vizsgálatokban, melyek között nem mutatkozott szignifikáns különbség. Ez esetben is a Cr^{3+} -hoz és Cu^{2+} -hez hasonló tendencia figyelhető meg: a sperma expozíciós ideje nem volt hatással a termékenyülési százalékra, azonban a koncentráció hatása szignifikáns ($p=0,0103$): már a sperma 600 mg/L, 30 percig tartó Ni^{2+} -expozíciója esetében csökkent a termékenyülés (37. ábra). A sperma expozíciós idejének, valamint az alkalmazott nehézfém-koncentrációk növelésével a kiváltott hatás mértéke is párhuzamosan növekedett. A termékenyülésre számított EC_{50} -érték a sperma 30 perces expozíciója esetében 647 mg/L, míg a 120 perces expozíció esetében 472 mg/L, melyek szignifikánsan alacsonyabbak, mint a PMOT-ban és VCL-ben azonos expozíciós idő mellett kapott értékek ($p<0,0001$ minden esetben). A sperma Ni^{2+} -expozíciója nem volt szignifikáns hatással a kontrollhoz viszonyított embrionális túlélésre egyik koncentráció esetében sem. Az embrionális torzulások kialakulásának arányát tekintve megállapítható, hogy a sperma 30 és 120 perces expozíciója nem volt szignifikáns hatással egyik vizsgált embrionális életkorban sem (38. ábra).



37. ábra: A zebra-dánió-sperma különböző koncentrációjú Ni^{2+} -kitettségének hatása a termékenyülési százalékra, valamint a fejlődő embriók 48 órás túlélésére (%), (szórással, $n=3$). A különböző színű oszlopok a sperma különböző expozíciós idejű Ni^{2+} -kitettségét jelölik (kék: 30 perces expozíció, zöld: 120 perces expozíció). Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (***) $p<0,001$, **** $p<0,0001$).

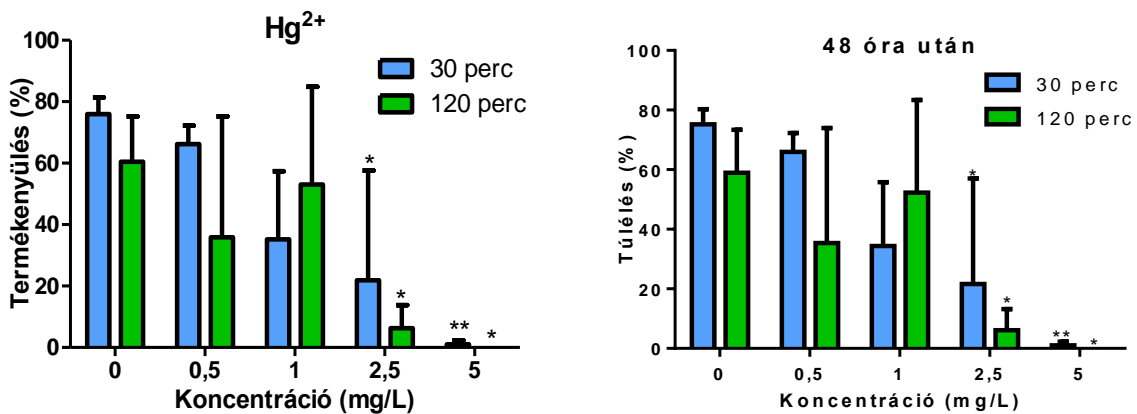


38. ábra: Embriionális deformitások kialakulásának aránya (%), szórással, $n=3$) a zebradánió-sperma különböző koncentrációjú Ni^{2+} -kitettséget követően, különböző expozíciós idők mellett, különböző embriionális életkorokban. **A:** a sperma 30 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **B:** a sperma 30 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban, **C:** a sperma 120 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **D:** a sperma 120 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban.

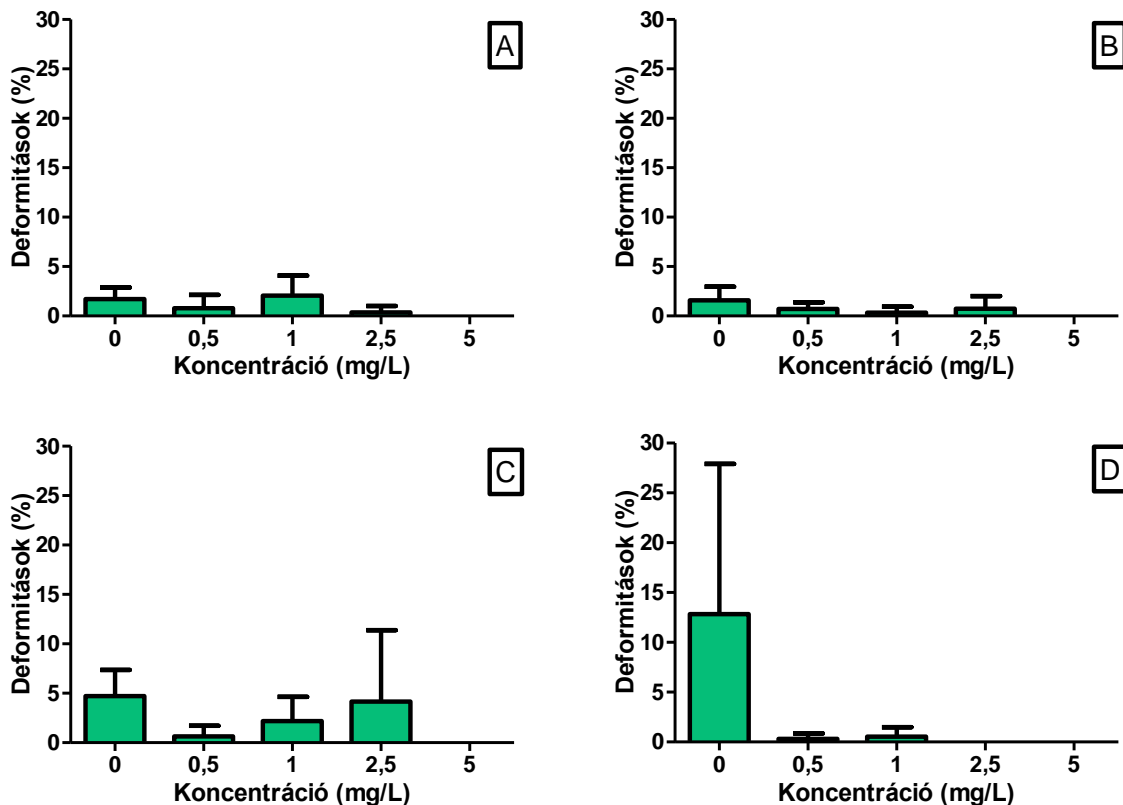
4.2.6 Hígany

A Hg^{2+} hatását vizsgálva a friss zebradánió-sperma PMOT-a $68 \pm 6\%$ ($n=3$) volt a 30 perces expozíciót vizsgáló kísérletekben, $72 \pm 4\%$ ($n=3$) pedig a 120 perces nehézfém-kitettség hatásának vizsgálata során, mely értékek nem mutattak szignifikáns különbséget. Ez esetben is megfigyelhető a Ni^{2+} -hez, Cr^{3+} -hoz és Cu^{2+} -hez hasonló tendencia: a sperma expozíciós ideje nem volt hatással a termékenyülésre, azonban az alkalmazott koncentrációk hatása szignifikánsnak mutatkozott ($p=0,0004$): már a sperma 30 perces, 2,5 mg/L-es Hg^{2+} -expozíciója szignifikáns csökkenést okozott, mely hatás a koncentráció növelésével párhuzamosan emelkedett (41. ábra). A sperma termékenyülésre számított EC_{50} -értéke a 30 perces Hg^{2+} -expozíció esetén 1,3 mg/L, a 120 perces toxikus expozíció esetében pedig 1,7 mg/L, melyek egyik motilitási paraméterre számított EC_{50} -értéktől sem különböznek szignifikánsan az adott expozíciós időpontok mellett. Az embriionális túlélés 48 órás életkorban történő vizsgálata során nem tapasztaltam egyik koncentráció esetében sem a kontrollhoz viszonyított szignifikáns különbséget. Az embriionális deformitások kialakulásának aránya a sperma Hg^{2+} -kitettsége esetén sem bizonyult

szignifikánsnak a kontrollhoz viszonyítva egyik expozíciós idő mellett, egyik vizsgált embrionális életkorban sem (42. ábra).



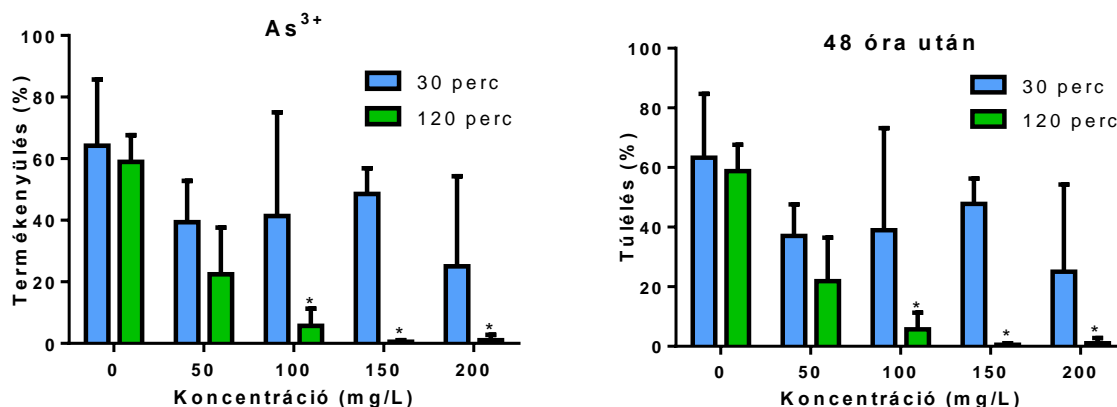
41. ábra: A zebradánió-sperma különböző koncentrációjú Hg^{2+} -kitettségének hatása a termékenyülési százalékra, valamint a fejlődő embriók 48 órás túlélésére (% , szórással, $n=3$). A különböző színű oszlopok a sperma különböző expozíciós idejű Hg^{2+} -kitettségét jelölik (kék: 30 perces expozíció, zöld: 120 perces expozíció). Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (* $p<0,05$, ** $p<0,01$).



42. ábra: Embrionális deformitások kialakulásának aránya (% , szórással, $n=3$) a zebradánió-sperma különböző koncentrációjú Hg^{2+} -kitettséget követően, különböző expozíciós idők mellett, különböző embrionális életkorokban. **A:** a sperma 30 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **B:** a sperma 30 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban, **C:** a sperma 120 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **D:** a sperma 120 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban.

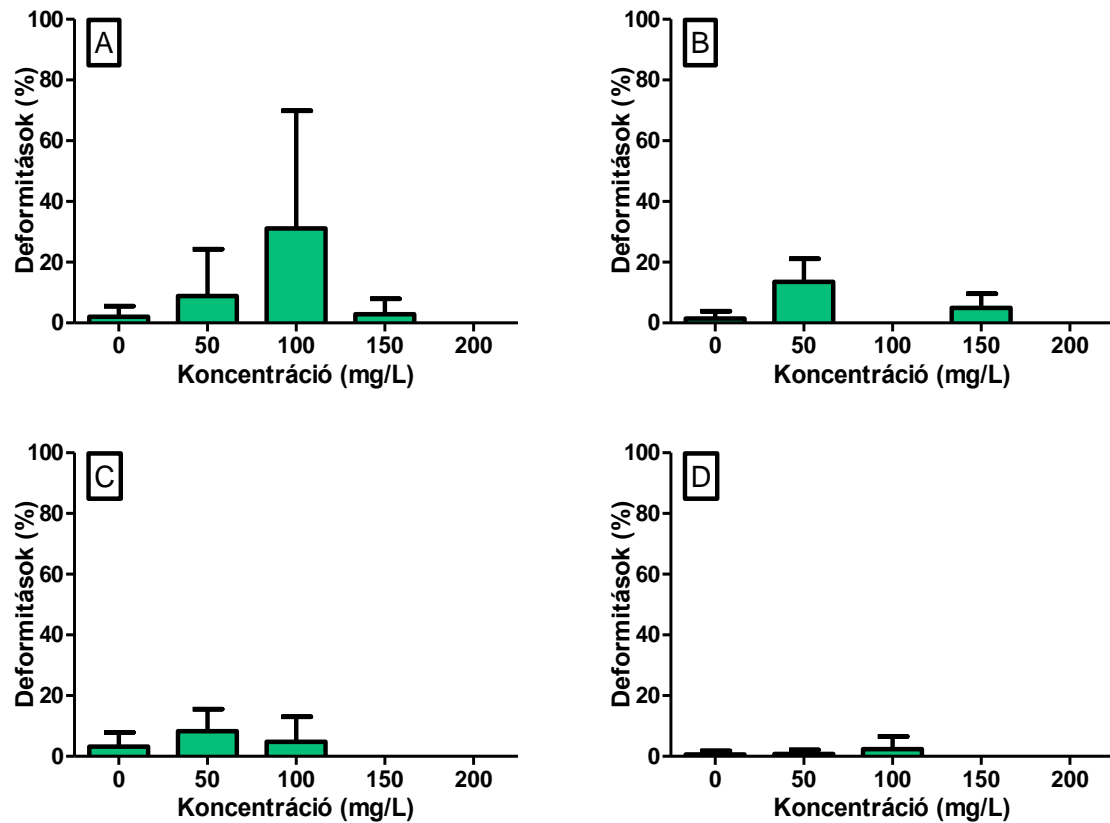
4.2.7 Arzén

Az As^{3+} vizsgálata során a sperma frissen mért PMOT értéke $72 \pm 5\%$ ($n=3$) volt a 30 perces expozíció hatását vizsgáló kísérletekben, valamint $74 \pm 7\%$ ($n=3$) a 120 perces kitettség hatását vizsgálóakban, mely értékek statisztikai egyezést mutatnak. Az As^{3+} vizsgálata során szignifikáns hatás mutatkozott a sperma expozíciós ideje ($p=0,0356$), valamint az alkalmazott koncentrációk tekintetében is ($p=0,0232$). A sperma 30 perces expozíciója még nem okozta a vizsgált paraméterek szignifikáns csökkenését, azonban a 120 perces expozíció már 100 mg/L-es koncentráció esetében szignifikáns csökkenést okozott (43. ábra). A vizsgált változók között nem állt fenn szignifikáns interakció. A termékenyülési százalékra számított EC_{50} -érték a sperma 30 perces expozíciója esetében 84 mg/L, a sperma 120 perces As^{3+} -kitettsége esetében pedig 58 mg/L, mely utóbbi a PMOT-ban és VCL-ben, azonos kitettségi időtartam mellett kapott értékekhez viszonyítva szignifikánsan magasabb ($p=0,0061$ és $p<0,0001$). A 48 órás embrionális életkorban vizsgált túlélés nem különbözött szignifikánsan a kontrolltól egyik koncentráció hatására sem. Az embrionális torzulások kialakulásának aránya a kontrollhoz viszonyítva nem volt szignifikáns a sperma egyik expozíciós ideje esetében, egyik vizsgált embrionális életkorban sem (44. ábra).



43. ábra: A zebradánio-sperma különböző koncentrációjú As^{3+} -kitettségének hatása a termékenyülési százaléokra, valamint a fejlődő embriók 48 órás túlélésére (% , szórással, $n=3$).

A különböző színű oszlopok a sperma különböző expozíciós idejű As^{3+} -kitettségét jelölik (kék: 30 perces expozíció, zöld: 120 perces expozíció). Csillag jelöli az adott expozíciós idő kontrolljához viszonyított szignifikáns különbséget (* $p<0,05$).



44. ábra: Embrionális deformitások kialakulásának aránya (%), szórással, $n=3$) a zebradánió-sperma különböző koncentrációjú As^{3+} -kitettséget követően, különböző expozíciós idők mellett, különböző embrionális életkorokban. **A:** a sperma 30 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **B:** a sperma 30 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban, **C:** a sperma 120 perces expozíciója esetén, 24 órás embriókban, **D:** a sperma 120 perces expozíciója esetén, 48 órás embriókban.

5. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

5.1 Toxikológiai célú spermavizsgálat

A toxikológiai célú spermavizsgálat során zebradánió és ponty fajban is dózis-hatás összefüggést találtam a különböző motilitási paraméterek és az alkalmazott nehézfém-koncentrációk között, minden vizsgált nehézfém esetében. A válasz mértéke azonban eltérő volt a vizsgált végpontok tekintetében. A sperma progresszív motilitása (PMOT) bizonyult a legérzékenyebb vizsgálati végpontnak: a kiváltott hatás mértéke itt volt a legnagyobb, és e paraméter esetében jelentkezett leelőször szignifikáns csökkenés. A számított EC_{50} -értékek tekintetében elmondható, hogy ugyan a PMOT esetében lehetett ezeket a legtöbb esetben kiszámolni, ám ezek néha magasabbnak bizonyultak, mint a VCL-ben kapott EC_{50} -értékek. A két vizsgált faj spermáján számított EC_{50} -értékek tekintetében is megfigyelhető különbség: néhol a zebradánió, néhol pedig a ponty spermája reagált érzékenyebben a nehézfém-kitettségre. Az As^{3+} esetében azonban az okozta a két faj közötti eltérést, hogy ez volt az egyetlen nehézfém, amely vizsgálata során eltérő koncentrációkat alkalmaztam a két fajban, a sperma ezzel a nehézfémmel szemben mutatott eltérő érzékenysége miatt. Elmondható ugyanakkor, hogy míg a zebradánió-spermán a toxikus hatás nem minden esetben jelentkezett azonnal a nehézfém-kitettséget követően, addig a pontyspermán már a vizsgálat kezdetén, az expozíció 30. percétől szignifikáns csökkenés volt tapasztalható a PMOT értékében.

A sperma mozgásának sebessége (VCL) kevésbé volt érzékeny mindkét faj esetében: a vizsgált koncentrációk alacsonyabb választ váltottak ki, mint a PMOT esetében. Ez megnyilvánult abban is, hogy kevesebb expozíciós időpontban lehetett ezen a paraméteren EC_{50} -értékeket számolni. Pontyban pedig nem is volt lehetséges minden nehézfém-kezelés során (Cu^{2+} és Ni^{2+} esetében) az EC_{50} -értékek kiszámítása az adott expozíciós időtartamok mellett. Ugyanakkor elmondható, hogy ezek az értékek néha alacsonyabbak voltak, mint a PMOT-ban kapottak. A spermiumok mozgásának egyenessége (LIN) bizonyult a legkevésbé érzékeny paraméternek a két vizsgált halfajban: sok nehézfém vizsgálata során nem volt megfigyelhető dózis-hatás összefüggés (Ni^{2+} esetében egyik halfajban sem, Cd^{2+} esetében zebradánióban). Volt, ahol az értékek növekedése volt tapasztalható (pontysperma Cu^{2+} -kitettsége során), és az EC_{50} -értékek számítása is csak pár nehézfém vizsgálata során volt lehetséges (Hg^{2+} esetében mindkét halfajban, As^{3+} esetében csak pontyban). A PMOT, a VCL és a LIN vizsgálata során a legtöbb nehézfém-kezelés hatására szignifikáns interakció volt megfigyelhető a vizsgált változók (expozíciós idő és koncentráció) között, ami magától értetődőnek tekinthető, mivel hatásuk összefonódik, emiatt felerősítik egymást.

Más publikációkban is leírták korábban a nehézfémek spermára *in vitro* kifejtett toxikus hatását, ám a sztenderdizáció hiánya, és ebből kifolyólag az eltérő körülmények között kivitelezett kísérletek miatt eredményeim sok esetben ellentmondanak a korábban publikáltaknak.

Zebradánó esetében, míg Acosta et al. (2016) szerint már 0,5 µg/L Cd²⁺ szignifikánsan csökkenti a sperma PMOT értékét és sebességi paramétereit (VAP, VCL, VSL) is 10 perces expozíciót követően, addig kísérleteimben 5 mg/L-es Cd²⁺-koncentráció volt szükséges, és ez is csak 120 perc után fejtette ki hatását a PMOT-ra, a VCL-ben pedig csak 180 perces kitettséget követően. Míg e korábbi publikáció szerint a PMOT és a VCL megegyező módon reagál a nehézfém-kitettségre, addig vizsgálataimból az a következtetés vonható le, hogy a PMOT érzékenyebb paraméter, mint a VCL, mivel a PMOT-on előbb megjelenik a toxikus kitettség hatása, mint a VCL értékén. Zebradánióban ezidáig nem volt fellelhető eredmény a másik hat nehézfém (Cr³⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, As³⁺, Hg²⁺) spermára *in vitro* kifejtett hatásáról, valamint a spermiumok LIN értékének expozíciót követő változásáról egyetlen toxikus anyag esetében sem.

A ponty spermájának toxikus expozíciót követő motilitását csak két esetben vizsgálták korábban, mindkettőben Cd²⁺-kitettség esetében. Ezek egyikében a Cd²⁺ az expozíciót követően azonnal csak 100 mg/L koncentráció hatására csökkent a motilitás szignifikánsan (HAYATI et al. 2017). Dietrich et al. (2011) azonban azonos expozíciós idő és koncentráció mellett nem tapasztalta a motilitás változását, csak 24 és 48 órás kitettség után, és csak 50 mg/L mellett, a motilitás és a sebesség esetében is. Ezzel szemben kísérleteimben már alacsonyabb, 25 mg/L Cd²⁺-koncentráció elegendő volt a motilitás és a sebesség azonnali (30 percet követő) csökkenéséhez.

A pontysperma VCL-értékének változásával 3 nehézfém esetében foglalkoztak eddig. A Cd²⁺ vizsgálatát illetően, a fentebb említett kísérleten kívül, még egy tanulmány született. Ebben 2 órás kitettség után 10 mg/L-es Cd²⁺-koncentráció mellett csökkent a hímivarsejtek VCL-értéke (CHYB et al. 2001b). Ez egybevág a kísérleteim során kapott eredményekkel, ahol az 5 mg/L-es kitettség még nem, viszont a 25 mg/L-es Cd²⁺-koncentráció a VCL 2 órás expozíció utáni szignifikáns csökkenését okozta. A Hg²⁺ VCL-re kifejtett hatását vizsgálva leírták, hogy már 0,05 mg/L hatására szignifikánsan csökken 2 órás expozíció után ponty esetében, 0,5 mg/L mellett pedig a motilitás teljes gátlása figyelhető meg (CHYB et al. 2001b). Kísérleteimben azonban a 0,5 mg/L-es koncentráció még nem okozott szignifikáns hatást, csak 2,5 mg/L Hg²⁺-kitettség mellett volt megfigyelhető azonos expozíciós idő mellett. A Zn²⁺ vizsgálata során pedig megállapították, hogy 100 mg/L szükséges a VCL értékének szignifikáns csökkenéséhez 2 órás kitettséget követően (CHYB et al. 2000), mely teljesen megegyezik az általam kapott eredményekkel. További 4 nehézfém (Cr³⁺, Cu²⁺, Ni²⁺, As³⁺) pontysperma sebességére kifejtett hatásáról eddig nem volt fellelhető irodalmi adat.

A Cu^{2+} pontyspermára *in vitro* kifejtett toxikus hatását csak egy esetben vizsgálták korábban, amelyben az enzimaktivitás mérésén keresztül vonták le következtetéseiket. Ebben csak 100 mg/L-es koncentráció mellett, 24 órás kitettséget követően jelentkezett a foszfátázsav-aktivitás csökkenése (SAROSIEK et al. 2009), míg kísérleteimben már 25 mg/L csökkentette a PMOT és VCL értékét az expozíció 30.percétől kezdődően. Ugyanezen vizsgálatban azonban már 10 mg/L Zn^{2+} és Cd^{2+} is szignifikánsan csökkentette a foszfátázsav-aktivitást, mely koncentráció azonos tartományban van az általam megfigyelt, motilitásra kifejtett hatásos koncentrációkkal. Következésképpen megállapítható, hogy a toxikus hatás következtében jelentkező enzimaktivitás, valamint motilitási paraméterek változása nem minden esetben korrelálnak egymással.

Az As^{3+} , Cr^{3+} és a Ni^{2+} pontyspermára kifejtett toxikus hatásáról nincs irodalmi adat semmilyen vizsgálati végpont esetében sem. A Cr^{3+} hatását is csak kecsge spermán tesztelték korábban, melyben 2 órás expozíció szignifikánsan csökkentette a sperma mozgási sebességét 5 mg/L esetében, azonban a motilitásra nem volt hatással. Ugyanezen koncentráció növelte a fehérje oxidáció, valamint a glutation-reduktáz és glutation-peroxidáz aktivitását, azonban a lipidperoxidáció és a szuperoxid-dizmutáz szintjét nem. Ugyanebben a kísérletben már 0,05 mg/L Cd^{2+} szignifikánsan csökkentette a sebességet, a motilitást azonban nem, mintahogy a fentebb említett antioxidáns paraméterek egyikét sem (LI et al. 2010a). Kísérleteimben 100 mg/L Cr^{3+} okozta a motilitás csökkenését mindkét pontyféle spermáján, valamint zebraadánió esetében a VCL csökkenését is, míg ponty esetében csak 150 mg/L okozta a VCL értékének szignifikáns csökkenését 2 órás expozíció után. Ezek alapján megállapítható, hogy a ponty és zebraadánió spermával szemben, ahol ponty esetében a PMOT érzékenyebb paraméternek bizonyult a VCL-nél, zebraadánió esetében pedig e két paraméter érzékenysége megegyezett ebben az expozíciós időpontban, addig a kecsge sperma esetében a hatás ellentétes: a sebesség érzékenyebben reagál a toxikus kitettségre, mint a motilitás. Megállapítható továbbá, hogy a kecsge spermája érzékenyebb a nehézfém-kezelésre, mint a kísérleteinkben használt két pontyféle: sokkal alacsonyabb koncentrációk mellett jelentkezett a sperma mozgási paramétereinek csökkenése, mint az általam elvégzett kísérletekben.

A Ni^{2+} halsperma motilitási paramétereire kifejtett hatásáról is csak egy publikáció született eddig, melyben azonnali kitettséget követően vizsgálták a motilitásra és sebességre kifejtett hatást sebes pisztráng, fejes domolykó, menyhal és afrikai harsca spermáján (LAHNSTEINER et al. 2004). Az eredmények szerint egyik halfaj spermáján sem jelent meg szignifikáns különbség még az alkalmazott legnagyobb, 125 mg/L-es koncentráció esetében sem. Ezen eredmények megegyeznek az általam megfigyelttel: vizsgálatomban csak 600 mg/L okozta azonnal (30 perces kitettség után) a PMOT és a VCL szignifikáns csökkenését pontyban,

míg 800 mg/L a VCL értékének szignifikáns csökkenését zebradánió esetében. Ezek alapján megállapítható, hogy a Ni^{2+} halspermára kifejtett toxicitása alacsony.

Az As^{3+} hatását korábban eddig más halfaj spermáján sem vizsgálták, semmilyen vizsgálati végpont esetében sem, így az általam kapott eredmények tekinthetőek az első irodalmi adatnak az As^{3+} halspermára kifejtett hatását illetően. Ezek alapján megállapítható, hogy zebradánió esetében csak 50 mg/L hatására csökken a PMOT szignifikánsan az expozíció 30. percétől, míg a VCL esetében csak a 60. perctől kezdve ugyanezen koncentráció mellett, 100 mg/L esetében viszont már a 30. perctől megfigyelhető ez a hatás. A zebradánió-sperma LIN értéke csak az alkalmazott legnagyobb, 200 mg/L-es koncentráció mellett mutatott szignifikáns csökkenést az expozíció 240. percében. Pontyban azonban ennél alacsonyabb koncentrációk mellett jelent meg szignifikáns hatás: 5 mg/L esetében már 90 perces expozíciót követően, 25 mg/L mellett pedig már a 30. perctől tapasztalható a PMOT és VCL értékének szignifikáns csökkenése, a LIN értéke pedig 120 perces kitettség után 50 mg/L mellett, míg 180 perc után már 25 mg/L esetén szignifikánsan csökkent. E két halfaj spermájának As^{3+} -kitettség során mutatkozó eltérő érzékenysége a szignifikánsan különböző EC_{50} -értékekben is megnyilvánul.

A toxikus anyagok sperma LIN értékére *in vitro* kifejtett hatását sem zebradánió, sem ponty esetében nem vizsgálták korábban. Egyetlen vizsgálatban foglalkoztak ezidáig ezen paraméter toxikus kitettséget követő vizsgálatával, melyben szivárványos pisztráng sperma 0, 4 és 24 órás Hg^{2+} és Cd^{2+} -expozícióját vizsgálták (DIETRICH et al. 2010). Ebben a LIN sokkal érzékenyebbnek bizonyult a Hg^{2+} -kitettséget követően, mint a motilitás vagy a VCL: 1 mg/L Hg^{2+} már 0 és 4 óra után szignifikáns csökkenést okozott a LIN értékében, azonban ez a hatás az expozíció 24. órájában már nem jelentkezett, csak 100 mg/L Hg^{2+} -kitettség mellett. Ezzel szemben a motilitás 0 és 4 óra után csak 10 mg/L Hg^{2+} hatására csökkent, a 24 órára pedig itt is már csak 100 mg/L Hg^{2+} -kitettség mellett. A VCL értéke mindhárom mérési időpont mellett csak 100 mg/L esetében csökkent szignifikánsan. Kísérleteimben azonban az expozíció kezdetén még nem jelentkezett a LIN értékének változása egyik koncentráció mellett sem, csak 2,5 mg/L hatására volt tapasztalható csökkenés, zebradánióban a 150. perctől, míg ponty esetében már a 90. perctől kezdve. Ez a hatás viszont az expozíciós idő növelésével párhuzamosan növekedett. Ezzel ellentétben a PMOT és VCL értékének csökkenése vizsgálataimban alacsonyabb koncentráció és expozíciós idő mellett jelentkezett.

A Cd^{2+} -expozíció LIN-re kifejtett hatását vizsgálva viszont ezzel ellentétes eredmény született ugyanebben a kísérletben. A LIN és a VCL érzékenysége megegyezett, mindkét paraméter esetében csak 100 mg/L okozott szignifikáns csökkenést az expozíció 0. órájától kezdve, míg a motilitás érzékenyebbnek bizonyult, mivel a 0. órában itt is csak 100 mg/L Cd^{2+} okozott szignifikáns csökkenést, azonban az expozíció 4. és 24. órájában már 10 mg/L Cd^{2+} -

kitettség mellett jelentkezett a hatás. Vizsgálataimban a zebradánió esetében nem volt megfigyelhető a Cd^{2+} LIN-re kifejtett hatása még a legnagyobb, 50 mg/L-es koncentráció vizsgálata során sem, azonban pontyban ugyanez a koncentráció már a 150. perctől kezdve szignifikánsan csökkentette annak értékét. A PMOT és a VCL értéke azonban már alacsonyabb koncentrációk és expozíciós idők mellett mutatott csökkenést. Összességében megállapítható, hogy a szivárványos pisztráng sperma esetében is a motilitás érzékenyebb paraméter a sebességnél, a mozgás egyenességének értéke azonban nem minden esetben adekvát módon reagál a kitettségre, így ennek megfigyelése nem vezet megbízható következtetésekre.

A nehézfémek halsperma motilitási paramétereire számított EC_{50} -értékeit korábban nem vizsgálták. A zebradánió és ponty spermán kapott motilitási eredményeimet összehasonlítva más szerzők azonos fajokban tett megfigyeléseivel megállapítható, hogy néha nagyságrendi eltérések is megfigyelhetők, ami az eltérő módszertanra vezethető vissza. Míg Acosta et al. (2016) a Cd^{2+} -expozíció zebradánió spermára kifejtett hatását vizsgálta, a spermát a herék eltávolításával nyerte, azt szobahőmérsékleten tárolta, és az immobilizálás és aktiválás során is eltérő hígítókat használt. Ezenkívül Dietrich et al. (2011) is a pontysperma Cd^{2+} -expozíciót követő vizsgálata során eltérő összetételű immobilizáló oldatot használt, ami befolyásolhatja a kapott eredményeket. Hayati et al. (2017) pedig az eltérő immobilizáló oldat használata mellett a Cd^{2+} motilitásra kifejtett hatását nem CASA-rendszer segítségével, hanem vizuálisan, szubjektív módon állapította meg. Ezzel ellentétben Chyb et al. (2000, 2001ab) kísérleteiben az általam is használt immobilizáló oldatot alkalmazta, valamint a sperma expozíciós ideje tekintetében is megfigyelhető átfedés a kísérleteink között, ennek ellenére a Hg^{2+} esetében kapott eredményeink mégis eltérők, a Cd^{2+} és Zn^{2+} esetében viszont megegyezők. Ebből is látható, hogy szükséges egy sztenderd *in vitro* toxikológiai spermavizsgálati módszertan kidolgozása, melyben a kísérlet minden részlete meghatározott, így a kapott eredmények összehasonlíthatóvá válnak. Doktori munkám során hét nehézfém sperma motilitási paramétereire vonatkozó hatását vizsgáltam két halfaj esetében is, azonos vizsgálati protokollt alkalmazva, melyet nagy mintaszámmal végeztem el, alacsony variancia mellett. Továbbá olyan nehézfémek spermatoxikológiai hatása is feltérképezésre került jelen munkában, melyről korábban nem volt szakirodalmi adat, így elmondható, hogy az általam kidolgozott módszer és a kapott eredmények egy megfelelő alapot szolgáltathatnak a sztenderdizációhoz.

5.2 A termékenyülés és az embriogenezis vizsgálata

A zebradánió-sperma toxikus expozíciót követő termékenyítőképességéről és az ezt követő embriogenezisének nincs fellelhető irodalmi adat egyik vizsgált nehézfém esetében sem, így

eredményeimet csak más fajokban kapott hasonló vizsgálatok eredményeivel tudom összehasonlítani. Kísérleteim során 2 nehézfém, a Zn^{2+} és a Cd^{2+} esetében nem tapasztaltam szignifikáns hatást ezen vizsgált paraméterekben. A motilitási paramétereket vizsgálva azonban megfigyelhető, hogy a zebradánió-sperma PMOT értéke a Cd^{2+} -kitettség 30. percétől szignifikáns csökkenést mutatott 50 mg/L-es koncentráció mellett. A VCL értékekben pedig mindkét nehézfém esetében már az expozíció 120. percétől megfigyelhető a csökkenés 25 mg/L-es koncentrációtól, mint ahogy Zn^{2+} esetében a PMOT-ban is, már 100 mg/L-es koncentráció mellett. A LIN értékében azonban szintén nem következett be változás a 30 és 120 perces expozíció alatt egyik nehézfém hatására sem. A Zn^{2+} esetében eddig nem volt fellelhető irodalmi adat a sperma termékenyítőképességére és az embrionális túlélésre kifejtett hatásról egy halfajban sem, a Cd^{2+} esetében viszont 2 halfajban is vizsgálták e hatásokat. Pontyban a Cd^{2+} sperma termékenyítőképességére kifejtett hatását vizsgálva megállapították, hogy a kitettséget követően azonnal csak 100 mg/L okozta a termékenyülés szignifikáns csökkenését, ahogyan a motilitását is, bár 50 mg/L mellett még nem volt megfigyelhető szignifikáns hatás (HAYATI et al. 2017). Kísérleteimben 50 mg/L Cd^{2+} -kitettség hatására 30 perc expozíció után megfigyelhető a motilitás minimális csökkenése, bár az feltételezhető, hogy a kitettséget követően azonnal vizsgálva még nem lett volna tapasztalható csökkenés az általam elvégzett vizsgálatokban sem. A termékenyülésben azonban kísérleteimben sem volt kimutatható szignifikáns hatás azonos koncentráció mellett, így feltételezhető, hogy 100 mg/L vizsgálata esetén Hayati et al. eredményeihez hasonlóan a termékenyülés csökkenését tapasztaltam volna.

Szivárványos pisztráng spermán a kelésre kifejtett hatást vizsgálták: eszerint 4 órás expozíció mellett 10 mg/L okozza a kelés arányának szignifikáns csökkenését, ahogy a motilitását is, a VCL és a LIN pedig csak 100 mg/L mellett csökkent (DIETRICH et al. 2010). Mivel kísérleteimben a termékenyítőképesség vizsgálata legfeljebb csak 120 perces expozíció mellett történt, így embriotoxikológiai eredményeink összehasonlítása nem lehetséges. Az viszont látható, hogy vizsgálataimban a PMOT már 5 mg/L, a VCL pedig 25 mg/L mellett szignifikánsan csökkent 4 órás expozíciót követően, ami arra utal, hogy a zebradánió-sperma értékenyebben reagál a Cd^{2+} -kitettségre, így egy 4 órás expozíciót követően a zebradánió embriók termékenyülési százalékában is megfigyelhető lehet szignifikáns hatás.

A másik 5 nehézfém (Cr^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Hg^{2+} , As^{3+}) szignifikáns hatást gyakorolt a termékenyülésre a sperma expozíciója esetében. A Cr^{3+} csak a sperma 120 perces kitettsége esetén, 100 mg/L koncentrációtól hatott szignifikánsan a termékenyítőképességre. Ezt összevetve a motilitási paraméterekkel megállapítható, hogy a PMOT érzékenyebben reagált: ugyan itt is csak a 100 mg/L-es kitettség okozott csökkenést, azonban már az expozíció 30. percétől kezdve. A VCL esetében a 30. perctől kezdve csak 150 mg/L vizsgálata során, a LIN esetében pedig csak 200 mg/L

Cr^{3+} -expozíció mellett volt megfigyelhető különbség. A termékenyülésre, valamint a sperma motilitási paramétereire számított EC_{50} -értékek között azonban megfigyelhető volt szignifikáns különbség: a termékenyítőképesség érzékenyebbnek bizonyult e nehézfém esetében. A Cr^{3+} sperma termékenyítőképességére kifejtett hatását eddig egy pontyféle esetében sem vizsgálták, szivárványos pisztrángban viszont ezzel ellentétben Billard és Roubaud (1985) már 0,0005 mg/L-es koncentráció mellett, 40 perces kitettség után szignifikáns csökkenést figyelt meg a termékenyülésben, viszont közvetlenül a spermára ennél magasabb koncentrációk fejtettek csak ki mérhető hatást, ami ellentétben áll az általam kapott eredményekkel. A sperma Cr^{3+} -kitettségét követően vizsgált embrionális túlélést korábban egy halfaj esetében sem tanulmányozták.

A Cu^{2+} sperma termékenyítőképességre kifejtett hatását vizsgálva azt tapasztaltam, hogy 25 mg/L esetében a sperma 120 perces expozícióját követően jelenik meg csökkenés, ahogy 50 mg/L esetében is. A PMOT esetében ugyanúgy a sperma 30 perces kitettségét követően még nem jelentkezett csökkenés, azonban a VCL értéknél már 25 mg/L Cu^{2+} is szignifikáns csökkenést eredményezett 30 perc után. Az EC_{50} -értékeket tekintve azonban megállapítható, hogy míg a sperma motilitási paramétereiben a 30 perces expozíciót követően még nem volt lehetséges ezen érték kiszámítása, addig a termékenyítőképesség esetében igen. Az expozíció 120. perce során azonban a PMOT-ban már 1 mg/L, a VCL-ben pedig 5 mg/L okozott szignifikáns csökkenést, így a kitettség ezen időszakában e két motilitási paraméter érzékenyebben reagált a sperma Cu^{2+} -kitettségére, mint a termékenyítőképesség. A 120 perces expozíció során kapott EC_{50} -értékeket vizsgálva megállapítható, hogy a PMOT-hoz viszonyítva nem tapasztalható szignifikáns különbség, azonban a VCL-hez képest a termékenyítőképességben alacsonyabb EC_{50} -értéket kaptam. Összességében megállapítható, hogy a sperma 30 perces expozíciója esetén a termékenyítőképesség volt az érzékenyebb vizsgálati paraméter, míg a 120 perces kitettség során a sperma progresszív motilitásának és termékenyítőképességének érzékenysége megegyezett. A LIN bizonyult mindkét expozíciós idő esetében a legkevésbé érzékenynek: egyik esetben sem volt megfigyelhető szignifikáns változás e paraméteren. A Cu^{2+} sperma termékenyítőképességére kifejtett hatásáról eddig csak 2 fajban volt fellelhető irodalmi adat. A kalászhalakúak rendjébe tartozó *Atherinops affinis* esetében a Cu^{2+} már nagyságrendekkel alacsonyabb, 56 $\mu\text{g/L}$ -es koncentrációtól szignifikáns hatással volt a termékenyülésre a sperma 15 perces expozíciója esetén (EC_{50} -érték = 109 $\mu\text{g/L}$; ANDERSON et al. 1991), míg szivárványos pisztrángban az 1 mg/L-es, 5 perces kitettség nem hatott szignifikánsan a termékenyülésre, azonban a kelési százalékban szignifikáns csökkenés volt megfigyelhető a kontrollhoz viszonyítva (SHAWN & BROWN 1971). Ez ellentmond az általam megfigyelteknek, miszerint e nehézfémekkel kezelt spermával termékenyítve a termékenyült ika túlélése a későbbiekben nem csökken szignifikánsan. Egy másik publikációban arról számoltak be, hogy 40 perces kitettség után már 0,5 mg/L-es Cu^{2+} -

koncentráció a termékenyülés csökkenését okozta, míg a sperma minőségében közvetlenül nem jelentkezett változás (BILLARD & ROUBAUD 1985). Ezeket az eredményeket összevetve megállapítható, hogy az *Atherinops affinis* spermája reagál legérzékenyebben a Cu^{2+} -kitettségre, ezt követi a szívárványos pisztráng, majd az általam kapott eredmények alapján a zebraadánió.

A Ni^{2+} vizsgálata során már a legalacsonyabb, 600 mg/L-es koncentráció mellett, 30 perces expozíció során jelentkezett a termékenyítőképesség szignifikáns csökkenése, ahogy a PMOT értéke is. A VCL azonban 600 mg/L mellett csak a 120 perces expozíció esetén, a 30 perces expozíció esetében pedig csak 800 mg/L mellett csökkent. A LIN értékében nem figyeltem meg változást egyik expozíciós idő mellett sem. Ezek alapján megállapítható, hogy a Ni^{2+} -kitettség a sperma termékenyítőképességét és PMOT értékét ugyanúgy befolyásolja, azonban a VCL értékét kevésbé. Az EC_{50} -értékeket tekintve megállapítható, hogy a PMOT-ban és VCL-ben kapott eredményekkel összevetve a termékenyítőképességre számított EC_{50} -értékek szignifikánsan alacsonyabbnak bizonyultak. A sperma Ni^{2+} -kitettségének termékenyítőképességre és kelésre kifejtett hatását eddig csak szívárványos pisztráng esetében vizsgálták, ahol azt tapasztalták, hogy 1 mg/L-es koncentráció, a hígítást követő azonnali termékenyítés során nem befolyásolja egyik paramétert sem (SHAWN & BROWN 1971). Ez megegyezik az általam kapott eredményekkel, azonban a szerzők magasabb koncentrációkat nem teszteltek, így további következtetéseket nem lehet levonni.

A Hg^{2+} spermára kifejtett hatásának vizsgálata során megállapítottam, hogy már a 30 perces expozíció során, 2,5 mg/L-es koncentráció mellett megfigyelhető a termékenyítőképesség csökkenése. A PMOT és a VCL esetében a 30. percben ugyanez a hatás figyelhető meg, 120 percnél azonban már 1 mg/L esetén csökken a PMOT és VCL értéke. Ez esetben is a LIN bizonyult a termékenyítőképességhez viszonyítva a legkevésbé érzékenynek: a 30. percnél még nincs szignifikáns hatás, és a 120. percnél is csak 5 mg/L esetében. Az EC_{50} -értékek összehasonlítása során nem jelentkezett szignifikáns különbség a motilitási paraméterekhez viszonyítva, egyik expozíciós időpontban sem. Billard és Roubaud (1985) szívárványos pisztrángban 1 mg/L-nél magasabb Hg^{2+} -koncentrációk mellett tapasztalták a termékenyítőképesség csökkenését a sperma 40 perces kitettsége esetén, mely megegyezik az általam tapasztaltakkal. Vizsgálatukban azonban a spermán közvetlenül megjelenő toxikus hatás alacsonyabb koncentrációk mellett nyilvánult meg, mint a termékenyítőképesség csökkenése, mely ellentmond a megfigyeléseimnek. Dietrich et al. (2010) viszont azt tapasztalta szívárványos pisztráng spermáját vizsgálva, hogy 4 órás expozíció után a Hg^{2+} csak 10 mg/L koncentráció esetében okozta a kelési százalék szignifikáns csökkenését, mint ahogy a motilitás értékének is. A VCL értéke azonban csak 100 mg/L esetében csökkent szignifikánsan, míg a LIN értéke már 1 mg/L esetén. Mivel vizsgálataimban a termékenyítőképesség vizsgálata legfeljebb csak a sperma

120 perces kitettségét követően valósult meg, így embriotoxikológiai eredményeink összehasonlítása nem lehetséges. Az viszont látható, hogy vizsgálataimban a PMOT és a VCL már 1 mg/L, a LIN pedig 2,5 mg/L mellett szignifikánsan csökkent 4 órás expozíciót követően, ami arra utal, hogy a zebradánió-sperma motilitási paraméterei érzékenyebben reagálnak a Hg^{2+} -kitettségre, mint a szivárványos pisztrángé, így a sperma 4 órás expozícióját követően a zebradánió ikra termékenyülési százalékában is megfigyelhető lehet szignifikáns hatás. Afrikai harcsa fajban a Hg^{2+} -kezelés hatását vizsgálva megállapították, hogy a sperma kitettségét követő azonnali termékenyítés esetében az 1 mg/L-es koncentráció szignifikánsan csökkenti a termékenyülést és a kelést is (RURANGWA et al. 1998). Ez alapján megállapítható, hogy az afrikai harcsa spermája érzékenyebb a Hg^{2+} -kitettségre, mint a zebradánióé.

A zebradánió-sperma As^{3+} -kitettsége esetén megállapítottam, hogy már 100 mg/L mellett megjelent a termékenyülés szignifikáns csökkenése a 120 perces expozíció során, míg a 30 perces expozíció nem okozta e vizsgálati végpont csökkenését. A PMOT és a VCL értéke is érzékenyebbnek bizonyult ennél: a 30. percben már 50 mg/L mellett szignifikánsan csökkent a PMOT, 100 mg/L mellett pedig a VCL értéke is. A 120. percben pedig mindkét motilitási paraméter már 50 mg/L-es koncentráció mellett szignifikánsan csökkent. A LIN értéke ez esetben sem mutatott szignifikáns csökkenést egyik expozíciós idő mellett sem, így ez a paraméter tekinthető mind közül a legkevésbé érzékenynek. Az EC_{50} -értékeket összehasonlítva azonban megállapítható, hogy míg a PMOT és a VCL vizsgálata során a mért értékek nem mutattak a kontrollhoz viszonyított 50%-os csökkenést az expozíció 30. percében, addig a termékenyülés igen. A kitettség 120. percében azonban már mindkét motilitási paraméteren lehetséges volt az EC_{50} -értékek kiszámítása, melyek szignifikánsan alacsonyabbak voltak a motilitási paramétereken, mint a termékenyítőképeségen. Az As^{3+} termékenyülésre és a fejlődő embriók túlélésére kifejtett hatásáról (ahogyan a Zn^{2+} esetében sem) a halsperma *in vitro* expozíciója esetén eddig nem volt fellelhető szakirodalmi adat. Általánosságban megállapítható, hogy az embriók 48 órás túlélése és az embrionális deformitások kialakulásának aránya egyik nehézfém esetében sem különbözött szignifikánsan a kontroll értékétől.

Az általam kapott EC_{50} -értékeket összehasonlítva a tengerisün-sperma nehézfém-kezelését követő termékenyülési eredményekkel (ARIZZI NOVELLI et al. 2003) megállapítható, hogy míg a tengeri sün (*Paracentrotus lividus*) esetében az EC_{50} -értékek egy órás expozíciót követően 0,017 és 8,4 mg/L között voltak, addig az általam kapott értékek még 120 perces expozíció mellett is ennél magasabbak (1,66 – 472,3 mg/L), melyből jól látszik, hogy a tengeri sün spermája érzékenyebb a nehézfém-kitettségre. A nehézfémek toxicitási sorrendjét összehasonlítva azonban megfigyelhető egyezés: míg Arizzi Novelli et al. (2003) kísérleteiben az embriófejlődésen megnyilvánuló toxicitási sorrend $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} > \text{Cr}^{3+} > \text{As}^{3+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$ volt, addig

vizsgálataimban $\text{Hg}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{As}^{3+} > \text{Cr}^{3+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$, melyből jól látszik, hogy mindkét fajban a Hg^{2+} és a Cu^{2+} volt a két legtoxikusabb nehézfém a sperma termékenyítőképességére nézve.

5.3 Általános következtetések

Az általam kapott eredményeket összehasonlítva a szakirodalomban fellelhető adatokkal megállapítható, hogy számos különbség mutatkozik az eredmények között, mely a kísérletek eltérő körülményeire vezethető vissza, azonban egyértelműen látszik, hogy a halsperma a nehézfém-expozícióra dózis-hatás, valamint idő-hatás összefüggésekkel reagál, így annak mérhető paraméterei képesek jelezni annak nehézfém-kitettségét. Emiatt a halsperma *in vitro* toxikológiai tesztrendszerként használható, mely számos előnnyel rendelkezik a halakon végzett *in vivo*, valamint az általánosan használt *in vitro* tesztrendszerekkel szemben is, azonban a korábban elvégzett kísérletek eredményeinek összehasonlítása az eltérő módszertan miatt sok esetben nehézségekbe ütközik. Ezt áthidalandó doktori munkám során egy egységes módszertan került kialakításra, amely gyors, egyszerűen és az állatvédelmi szempontok figyelembe vételével kivitelezhető, megismételhető, valamint megbízható eredményt ad. Ennek folyamata a következőkben foglalható össze: (1) 10 μL (zebradánió vagy ponty) sperma hígítása 50 μL pontyféle immobilizáló oldatban; (2) a hígított sperma 10 μL -jének továbbhígítása 1:1 arányban a toxikus anyagot tartalmazó immobilizáló oldattal, így elérve a végső tesztelendő nehézfém-koncentrációt; (3) a 120-240 percre terjedő expozíció alatt a minták olvadó jégen tárolása; (4) a tesztelt anyag toxicitásának mérése CASA-rendszerrel vagy termékenyítési kísérlet elvégzésével.

Az expozíciós idő tekintetében megállapítható, hogy annak előrehaladtával a kísérlet varianciájának mértéke (szórásban kifejezve) a legtöbb esetben csökkent, vagyis megbízhatóbb eredmények kaphatóak az expozíciós idő vége felé haladva, ami indokolttá teszi a minél hosszabb kitettség alkalmazását. Mindazonáltal sok esetben az expozíció elején még nem tapasztalható a nehézfémek toxikus hatása, ami szintén indokolja a hosszabb expozíciós idő használatát.

A sperma toxikus kitettségét követő vizsgálatok végpontjait összevetve nehézfémeként eltérő, hogy a sperma motilitási paraméterei, vagy pedig a termékenyítőképessége reagált-e érzékenyebben az expozícióra. A Cd^{2+} és Zn^{2+} esetében azonban a terhelt sperma termékenyítőképességén nem jelentkezett szignifikáns hatás. Ezen túlmenően a sperma motilitási paramétereinek vizsgálata számos előnnyel rendelkezik a termékenyítőképesség vizsgálatával szemben: (1) a motilitásvizsgálat bármikor elvégezhető, míg a termékenyítési kísérletekre csak az ikra rendelkezésre állása esetén van lehetőség; (2) a motilitásvizsgálat eredménye nem függ az ikra minőségétől és ezáltal megbízhatóbb eredményt ad; (3) a mozgási paraméterek valós időben

(real-time) képesek jelezni a spermát érő toxikus hatásokat, míg a termékenyülési százalék megállapítása csak a termékenyítést követően legalább 2-3 óra elteltével lehetséges. Ennek ellenére a termékenyülési százalék a legtöbb esetben képes jelezni a sperma esetleges nehézfém-kitettségét, úgyhogy ennek vizsgálata CASA-rendszer hiányában indokolt lehet.

5.4 Javaslato

Eredményeim alapján a következő javaslatokat teszem:

- Javaslom a zebraadánió- és pontysperma *in vitro* toxikológiai célú vizsgálatát a disszertációban kidolgozott egységes módszertan szerint, mellyel környezeti minták esetleges nehézfém-szennyezettsége megállapítható.
- Javaslom a minél hosszabb idejű toxikus expozíciót (180-240 perc), mely által megbízhatóbb eredmények kaphatóak.
- Javaslom toxikológiai vizsgálati végpontként a sperma progresszív motilitásának (PMOT) mérését, mely mind a hét vizsgált nehézfém esetében a legérzékenyebb kísérleti végpontnak bizonyult.
- Javaslom termékenyítési kísérletek elvégzését a terhelt spermával a kidolgozott módszertan szerint, amennyiben nem áll rendelkezésre CASA-rendszer a sperma motilitásának detektálásához.

A jövőben zajló kutatásokat tekintve pedig a következő javaslatokkal élnék:

- Javaslom más családba tartozó halfajok spermáján vizsgálni ezen vegyületek hatását a disszertációban kidolgozott módszertan szerint, hogy megbízhatóan fel lehessen állítani egy fajok közötti érzékenységi sorrendet.
- Javaslom más vegyületcsoportba tartozó anyagok toxikus hatásának feltérképezését a kidolgozott módszertan alapul véve, hogy összehasonlítható legyen különböző vegyületek halspermára gyakorolt hatása.

6. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Kidolgoztam egy halsperma vizsgálatán alapuló *in vitro* toxikológiai tesztrendszer, amellyel feltérképeztem hét nehézfém (króm, cink, kadmium, nikkel, réz, arzén és higany) zebradánió- és pontyspermára kifejtett hatását.
2. Bebizonyítottam, hogy a zebradánió- és a pontysperma dózis-hatás, valamint idő-hatás összefüggésekkel reagál a toxikus expozícióra ezen nehézfémek esetében.
3. Megállapítottam, hogy a vizsgált mozgási paraméterek közül a sperma progresszív motilitása reagál a legérzékenyebben a nehézfém-kitettségre zebradánió és ponty fajban.
4. Meghatároztam félhatásos koncentrációkat (EC_{50} -értékek) a zebradánió- és pontysperma motilitási paramétereire (progresszív motilitás, sebesség, a mozgás egyenessége), valamint a zebradánió-sperma termékenyítőképességére vonatkoztatva a sperma nehézfém-kitettséget követően.
5. Megállapítottam, hogy zebradánió fajban az általam vizsgált hét nehézfémmel terhelt spermával termékenyítve az embrionális deformitások kialakulásának aránya és a túlélés nem változik szignifikánsan az embriók 48 óráig.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A halsperma számos olyan előnyös tulajdonsággal rendelkezik, melyek alkalmas modellé teszik *in vitro* toxikológiai vizsgálatokhoz (nem invazív kinyerés, mérhető paraméterek, dózis-hatás reakció stb.). Ennek köszönhetően számos publikáció született ezidáig, melyben halspermát használtak fel toxikológiai tesztrendszerként, ám ezen kísérletek nem egységes módszertan szerint végezték el (sperma kezelése, mért változó, expozíciós idő stb.), ezért eredményeik összehasonlítása nehézségekbe ütközik.

Doktori munkám során kidolgoztam egy halspermium vizsgálatára alapozott *in vitro* toxikológiai tesztrendszert, mellyel vizsgáltam hét nehézfém (króm, cink, réz, kadmium, nikkel, higany és arzén) zebradánió- és pontysperma motilitási paramétereire kifejtett hatását. Ezen kívül feltérképeztem az említett nehézfémek hatását a zebradánió-sperma termékenyítőképességére, az embrionális túlélésre és a deformitások kialakulására. A sperma motilitási paramétereinek vizsgálata során megállapítottam, hogy a progresszív motilitás (PMOT) a legérzékenyebb: mind a hét vizsgált nehézfém esetében dózis-hatás, valamint idő-hatás összefüggést tapasztaltam mindkét halfaj spermáján. A sperma sebessége (VCL) kevésbé érzékenynek bizonyult: ugyan mind a hét nehézfém vizsgálata során megjelent a dózis-hatás, valamint idő-hatás összefüggés mindkét pontyféle spermáján, azonban az alkalmazott koncentrációk alacsonyabb választ indukáltak. A spermiumok mozgásának egyenessége (LIN) bizonyult a legkevésbé érzékeny végpontnak: sok nehézfém esetében nem jelentkezett dózis-hatás összefüggés, és az EC_{50} -értékek kiszámítása is csak néhány esetben volt lehetséges.

A zebradánió- és pontyspermában kapott eredményeket összehasonlítva megállapítható, hogy hat nehézfém esetében ugyanabban a koncentráció-tartományban volt a toxikus anyagok hatása megfigyelhető. Egyedül az arzén vizsgálata során volt szükséges más koncentráció-tartomány alkalmazása a toxikus hatás kiváltásához, ami alapján megállapítható, hogy a két halfaj spermájának érzékenysége csak az arzén-kitettséggel szemben eltérő: a ponty spermája érzékenyebbnek bizonyult. A zebradánió-sperma esetében hat nehézfém (króm, cink, réz, nikkel, higany és arzén), pontyban pedig négy nehézfém (króm, réz, nikkel, arzén) motilitásra kifejtett *in vitro* hatásáról ezidáig nem volt szakirodalmi adat. Az arzén spermára kifejtett hatását eddig egyetlen halfajban sem vizsgálták.

A kidolgozott protokollal elvégeztem a zebradánió-sperma termékenyítőképességének, az embriók 48 órás korban vizsgált túlélésének, valamint az embrionális deformitások arányának vizsgálatát a sperma azonos koncentrációjú nehézfém-kitettséget követően. Az alkalmazott expozíciós idők mellett (30 és 120 perc) néhány esetben a termékenyülési százalék (pl. Cu^{2+} : 30 perc; Cr^{3+} : 120 perc), más esetekben pedig a progresszív motilitás bizonyult érzékenyebb

vizsgálati végpontnak (pl. Cd^{2+} és Zn^{2+} : 30 és 120 perc; Cr^{3+} : 30 perc), és volt olyan, ahol ezek érzékenysége megegyezett (pl. Ni^{2+} : 30 és 120 perc). Az EC_{50} -értékek összehasonlítása során azonban számos esetben jelentkezett szignifikáns különbség a motilitáson és a termékenyítőképességen mért értékek között. Megállapítható továbbá, hogy a nehézfémekkel terhelt spermával termékenyítve a fejlődő embriók életképessége és az embrionális deformitások kialakulásának aránya nem változik szignifikánsan az embriók 48 órás koráig. Nem rendelkezünk irodalmi adatokkal a hét vizsgált nehézfém hatásáról a zebra-dánió-sperma termékenyítőképességre, az embrionális túlélésre, valamint a deformitások kialakulására. Az arzén és cink ezirányú hatását pedig eddig egyetlen halfaj esetében sem vizsgálták. Általánosságban azonban elmondható, hogy a sperma motilitási paramétereinek vizsgálata számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik a termékenyítőképesség vizsgálatával szemben: (1) a motilitásvizsgálat bármikor elvégezhető, míg a termékenyítési kísérletekhez ikrára is szükség van; (2) a motilitásvizsgálat eredménye nem függ az ikra minőségétől és ezáltal megbízhatóbb eredményt ad; (3) a mozgási paraméterek valós időben (real-time) képesek jelezni a spermát érő toxikus hatásokat, míg a termékenyülési százalék megállapítása csak a termékenyítést követően legalább 2-3 óra elteltével lehetséges. Ennek ellenére a termékenyülési százalék is képes jelezni a sperma esetleges nehézfém-kitettséget a legtöbb esetben, úgyhogy ennek vizsgálata CASA-rendszer hiányában indokolt lehet.

A doktori munkám során kialakított *in vitro* halspermium-vizsgálati módszertan az alábbiakban foglalható össze: (1) 10 μL (zebra-dánió vagy ponty) sperma hígítása 50 μL pontyféle immobilizáló oldatban; (2) a hígított sperma 10 μL -jének továbbhígítása 1:1 arányban a toxikus anyagot tartalmazó immobilizáló oldattal, így elérve a végső tesztelendő nehézfém-koncentrációt; (3) a 120-240 percig terjedő expozíció alatt a minták olvadó jégen tárolása; (4) a tesztelt anyag toxicitásának mérése CASA-rendszerrel vagy termékenyítési kísérlet elvégzésével.

8. SUMMARY

Fish sperm has some advantages which make it a suitable model to *in vitro* toxicological examinations (non-invasive stripping, measurable parameters, dose-response reaction etc.). Consequently, numerous studies have been carried out on the use of fish sperm in toxicological tests, however, these experiments have not been carried out according to a uniform method (handling of sperm, measured variables, exposure time etc.), thus, a comparison of their results is difficult.

During my doctoral work, I have developed an *in vitro* toxicological test system based on fish sperm analysis, and used it to investigate the effect of seven heavy metals (chromium, zinc, copper, cadmium, nickel, mercury and arsenic) on motility parameters of zebrafish and common carp sperm, furthermore, on fertilizing ability of zebrafish sperm, on embryonic survival and developing of embryonic deformities fertilized with exposed sperm. Through the examination of sperm motility parameters, I have determined that progressive motility (PMOT) is the most sensitive one: I have observed dose-response and time-response in cases of all of the seven tested heavy metals on sperm of both cyprinids. The velocity of sperm (VCL) proved to be less sensitive: dose-response and time-response were observed in cases of all of the seven heavy metals on sperm of both fish species, however, the applied concentrations have induced lower response. The linearity of the moving of spermatozoa (LIN) was the least sensitive endpoint: dose-response was not detected in most heavy metals and the calculation of EC₅₀ values was possible only in few cases.

Comparing the results produced on zebrafish and common carp sperm, it can be concluded that the effect of toxicants was observed in the same range of concentrations in cases of six heavy metals. A different range of concentrations was needed to trigger toxic effect only in case of arsenic. Thus, it can be concluded that the sensitivity of the sperm of these two fish species is different only to the arsenic-exposure: the sperm of common carp proved to be more sensitive. No prior information was available regarding the *in vitro* effect of six heavy metals (chromium, zinc, copper, nickel, mercury, arsenic) on zebrafish sperm motility and of four heavy metals (chromium, copper, nickel, arsenic) on common carp sperm motility until now. The effect of arsenic on sperm has not been investigated in case of any fish species until now.

Further investigations were carried out on the fertilizing capacity of zebrafish sperm, on the 48-hour embryonic survival and on the development of embryonic deformities followed heavy metal exposure of sperm at the same concentrations. In some cases, the fertilization rate has proved to be the more sensitive endpoint (e.g. Cu²⁺: 30 minutes; Cr³⁺: 120 minutes), while in other cases, the progressive motility has found more sensitive (e.g. Cd²⁺ and Zn²⁺: 30 and 120 minutes; Cr³⁺:

30 minutes), and there were some cases where the sensitivity of these was the same (e.g. Ni²⁺: 30 and 120 perc) next to the applied exposure durations (30 and 120 minutes). Through the comparison of the EC₅₀ values, a significant difference has presented between the values measured in motility and fertilizing ability in some cases. Furthermore, it can be concluded that the survival of developing embryos and embryonic deformities do not change significantly until the 48-hour age of embryos following fertilization with sperm exposed by heavy metals. Again, no prior information was available concerning the effect of exposed zebrafish sperm on the fertilizing ability in cases of 6 heavy metals (chromium, zinc, copper, nickel, mercury and arsenic), nor on the effect of any of the investigated heavy metals on embryonic survival and the development of embryonic malformations. Moreover, the effect of arsenic and zinc has not been examined in case of any fish species until now. In general, the examination of sperm motility parameters has some advantages over the examination of fertilizing capacity: (1) motility assessment can be carried out any time, while fertilization tests are possible only when eggs are available; (2) results of motility analysis do not depend on the quality of eggs, thus, they can give more reliable results; (3) motility parameters are able to detect toxic effects in sperm in real time, while the reliable estimation of fertilization rate is possible at least 2-3 hours after fertilization. Despite of this, also the fertilization rate is able to indicate the possible heavy metal exposure of sperm, thus its examination can be reasonable in the lack of a CASA system.

The *in vitro* protocol for fish sperm analysis developed during my doctoral work can be summarized as follows: (1) dilution of 10 μ L (zebrafish or common carp) sperm in cyprinid immobilising solution; (2) further dilution of 10 μ L prediluted sperm in 1:1 dilution rate with immobilising media containing toxic solution to reach the final concentration of the tested heavy metal; (3) storage of samples on melting ice during the 120-240 minutes of exposure; (4) measurement of toxicity caused by the tested metal with CASA system or with carrying out of fertilization experiments.

9. MELLÉKLETEK

M1. Irodalomjegyzék

- ABASCAL, F.J., COSSON, J., FAUVEL, C. (2007): Characterization of sperm motility in sea bass: the effect of heavy metals and physicochemical variables on sperm motility. *Journal of Fish Biology* 70: 509-522.
- ABDALLAH, F.B., HAMDEN, K., GALERAUD-DENIS, I., EL FEKI, A., KESKES-AMMAR, L. (2009): An *in vitro* study on reproductive toxicology of Deltamethrin on rat spermatozoa. *Andrologia* 42: 254-259.
- ACOSTA, I.B., VARELA JUNIOR, A.S., SILVA, E.F., CARDOSO, T.F., CALDAS, J.S., JARDIM, R.D., CORCINI, C.D. (2016): Effects of exposure to cadmium in sperm cells of zebrafish, *Danio rerio*. *Toxicology Reports* 3: 696-700.
- AJAO, C., ANDERSSON, M.A., TEPLOVA, V.V., NAGY, SZ., GAHMBERG, C.G., ANDERSSON, L.C., HAUTANIEMI, M., KAKASI, B., ROIVAINEN, M., SALKINOJA-SALONEN, M. (2015): Mitochondrial toxicity of triclosan on mammalian cells. *Toxicology Reports* 2: 624-637.
- ALAM, M.K., MAUGHAN, O.E. (1992): The Effect of Malathion, Diazinon, and Various Concentrations of Zinc, Copper, Nickel, Lead, Iron, and Mercury on Fish. *Biological Trace Element Research* 34: 225-236.
- ALAVI, S.M.H., COSSON, J. (2005): Sperm motility in fishes. (I). Effects of temperature and pH: A review. *Cell Biology International* 29(2): 101-110.
- ALAVI, S.M.H., COSSON, J. (2006): Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. *Cell Biology International* 30: 1-14.
- ALSOP, D., WOOD, C.M. (2011): Metal uptake and acute toxicity in zebrafish: Common mechanisms across multiple metals. *Aquatic Toxicology* 105(3-4): 385-393.
- ANDERSON, W.A., PERSONNE, P. (1970): The localization of glycogen in the spermatozoa of various invertebrate and vertebrate species. *Journal of Cell Biology* 44: 29-51.
- ANDERSON, B.S., MIDDAUGH, D.P., HUNT, J.W., TURPEN, S.L. (1991): Copper Toxicity to Sperm, Embryos and Larvae of Topsmelt *Atherinops affinis*, with Notes on Induced Spawning. *Marine Environmental Research* 31: 17-35.
- ANDERSSON, M.A., JÄÄSKELÄINEN, E.L., SHAHEEN, R., PIRHONEN, T., WIJNANDS, L.M., SALKINOJA-SALONEN, M.S. (2004): Sperm bioassay for rapid detection of cereulide-producing *Bacillus cereus* in food and related environments. *International Journal of Food Microbiology* 94: 175-183.

- ANDERSSON, M.A., MIKKOLA, R., HELIN, J., ANDERSSON, M.C., SALKINOJA-SALONEN, M. (1998): A Novel Sensitive Bioassay for Detection of *Bacillus cereus* Emetic Toxin and Related Depsipeptide Ionophores. *Applied and Environmental Microbiology* 64(4): 1338-1343.
- ANDERSSON, M.A., MIKKOLA, R., RASIMUS, S., HOORNSTA, D., SALIN, P., RAHKILA, R., HEIKKINEN, M., MATTILA, S., PELTOLA, J., KALSO, S., SALKINOJA-SALONEN, M. (2010): Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosols. *Toxicology in Vitro* 24: 2041-2052.
- ANDERSSON, M.A., NIKULIN, M., KÖLJALG, U., ANDERSSON, M.C., RAINEY, F., REIJULA, K., HINTIKKA, E.L., SALKINOJA-SALONEN, M. (1997): Bacteria, Molds, and Toxin sin Water-Damaged Building Materials. *Applied and Environmental Microbiology* 63(2): 387-393.
- ARIZZI NOVELLI, A., ARGESE, E., TAGLIAPIETRE, D., BETTIOL, C., VOLPI GHIRARDINI A. (2002): Toxicity of tributyltin and triphenyltin towards early life stages of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 859-864.
- ARIZZI NOVELLI, A., LOSSO, C., GHETTI, P.F., VOLPI GHIRARDINI, A. (2003): Toxicity of heavy metals using sperm cell and embryo toxicity bioassays with *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea): comparisons with exposure concentrations in the Lagoon of Venice, Italy. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(6): 1295-1301.
- AZIZ, D.M. (2006): Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. *Theriogenology* 92: 1-8.
- BACCETTI, B., BURRINI, A.G., CALLAINI, G., GIBERTINI, G., MAZZINI, M., ZERUNIAN, S. (1984): Fish Germinal Spermatology Cells. I. Comparative of Seven Cyprinid Species. *Gamete Research* 10: 373-396.
- BADSHA, K.S., GOLDSPIK, C.R. (1982): Preliminary observations on the heavy metal content of four species of freshwater fish in NW England. *Journal of Fish Biology* 21: 251-267.
- BAUMANS, V. (2005): Science-based assessment of animal welfare: laboratory animals. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)* 24(2): 503-514.
- BERNÁTH, G., ZARSKI, D., KÁSA, E., STASZNY, Á., VÁRKONYI, L., KOLLÁR, T., HEGYI, Á., BOKOR, Z., URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á. (2016): Improvement of Common Carp (*Cyprinus carpio*) sperm Cryopreservation Using a Programable Freezer. *General and Comparative Endocrinology* 237: 78-88.

- BERNÁTH, G., ZARSKI, D., KREJSZEFF, S., PALINSKA-ZARSKA, K., BOKOR, Z., KROL, J., KOLLÁR, T., KUCHARCZYK, D., URBÁNYI, B., HORVÁTH, Á. (2014): Optimization of conditions for the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) sperm. *Journal of Applied Ichthyology* 31(1): 94-98.
- BHAVANI, K., KARUPPASAMY, R. (2014): Acute toxicity bioassay and behavioural changes on zebra fish, *Danio rerio* (Hamilton) under arsenic trioxide. *International Journal of Modern Research and Reviews* 2(1): 40-46.
- BILLARD, R. (1983): A quantitative analysis of spermatogenesis in the trout *Salmo trutta* fario. *Cell Tissue Research* 230: 495–502.
- BILLARD, R. (1990): Spermatogenesis in teleost fish. In: Lamming, G.E. (Szerk.) *Marshall's Physiology of Reproduction*, Volume II. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 183–212.
- BILLARD, R., COSSON, M.P. (1992): Some Problems Related to the Assessment of Sperm Motility in Freshwater Fish. *The Journal of Experimental Zoology* 261: 122-131.
- BILLARD, R., ROUBAUD, P. (1985): The effect of metals and cyanide on fertilization in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Water Research* 19: 209-214.
- BRITO, L.F.C., ALTHOUSE, G.C., AURICH, C., CHENOWETH, P.J., EILTS, B.E., LOVE, C.C., LUVONI, G.C., MITCHELL, J.R., PETER, A.T., PUGH, D.G., WABERSKI, D. (2016): Andrology laboratory review: Evaluation of sperm concentration. *Theriogenology* 85(9): 1507-1527.
- BROMAGE, N.R. (1992): Propagation and stock improvement. In: Shepherd, C.J., Bromage, N.R. (Szerk.) *Intensive Fish Farming*, Wiley-Blackwell, Hoboken, New Jersey, USA, p. 103-153.
- CABRITA, E., ROBLES, V., CUÑADO, S., WALLACE, J.C., SARASQUETE, C., HERRÁEZ M.P. (2005a): Evaluation of gilthead seabream, *Sparus aurata*, sperm quality after cryopreservation in 5 ml macrotubes. *Cryobiology* 50: 273-284.
- CABRITA, E., ROBLES, V., REBORDINOS, L., SARASQUETE, C., HERRÁEZ, M.P. (2005b): Evaluation of DNA damage in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and gilthead sea bream (*Sparus aurata*) cryopreserved sperm. *Cryobiology* 50: 144-153.
- CABRITA, E., ROBLES, V., HERRÁEZ, M.P. (2009): Sperm quality assessment. In: Cabrita, E., Robles, V., Herráez, M.P. (Szerk.) *Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species, Biology Series*, CRC Press (Taylor and Francis Group), Boca Raton, Florida, USA, p. 93-148.
- CABRITA, E., MA, S., DIOGO, P., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., SARASQUETE, C., DINIS, M.T. (2011a): The influence of certain amino acids and vitamins in post-thaw fish sperm motility, viability and DNA fragmentation. *Animal Reproduction Science* 125:189-195.

- CABRITA, E., ROBLES, V., SARASQUETE, C., HERRÁEZ, M.P. (2011b): New insights on sperm quality analysis for the improvement of broodstock. In: Tiersch, T., Mazik, P.M. (Szerk.) *Cryopreservation of Aquatic Species* (2. kiadás), World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA, p. 146-161.
- CABRITA, E., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., GAVAIA, P.J., RIESCO, M.F., VALCARCE, D.G., SARASQUETE, C., HERRÁEZ, M.P., ROBLES, V. (2014): Factors enhancing fish sperm quality and emerging tools for sperm analysis. *Aquaculture* 432: 389-401.
- CABRITA, E., SARASQUETE, C., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., ROBLES, V., BEIRAO, J., PÉREZ-CEREZALES, S., HERRÁEZ, M.P. (2010): Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. *Journal of Applied Ichthyology* 26(5): 623-635.
- CAMBI, M., TAMBURRINO, L., MARCHIANI, S., OLIVITO, B., AZZARI, C., FORTI, G., BALDI, E., MURATORI, M. (2013): Development of a specific method to evaluate 8-hydroxy, 2-deoxyguanosine in sperm nuclei: relationship with semen quality in a cohort of 94 subjects. *Reproduction* 145: 227-235.
- CASTELLANOS, P., MAROTO-MORALES, A., GARCÍA-ÁLVAREZ, O., GARDE, J.J., MATEO, R. (2013): Identification of Optimal Concentrations and Incubation Times for the Study of In Vitro Effects of Pb in Ram Spermatozoa. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 91: 197-201.
- CASTELLANOS, P., MAROTO-MORALES, A., GARCÍA-ÁLVAREZ, O., GARDE, J.J., MATEO, R. (2016): An *In Vitro* Evaluation of Biochemical Processes Involved in Lead-Induced Changes on Ram Spermatozoa. *Reproduction in Domestic Animals* 51: 421-427.
- CHAPEAU, C., GAGNON, C. (1986): Nitrocellulose and polyvinyl coatings prevent sperm adhesion to glass without affecting the motility of intact and demembrated human spermatozoa. *Journal of Andrology* 8(1): 34-40.
- CHAPIN, R.E., WINTON, T., NOWLAND, W., DANIS, N., KUMPF, S., JOHNSON, K., COBURN, A., STUKENBORG, J.B. (2016): Lost in translation: The search for an *in vitro* screen for spermatogenic toxicity. *Birth Defects Research Part B* 107: 225-242.
- CHYB, J., KIME, D.E., MIKOLAJCZYK, T., SZCZERBIK, P., EPLER, P. (2000): Influence of zinc on sperm motility of common carp – a computer assisted studies. *Archives of Polish Fisheries* 8: 5-14.
- CHYB, J., KIME, D.E., SZCZERBIK, P., MIKOLAJCZYK, T. EPLER, P. (2001a): Computer assisted analysis (CASA) of common carp *Cyprinus carpio* L. spermatozoa motility in the presence of cadmium. *Archives of Polish Fisheries* 9: 173-181.

- CHYB, J., SOKOLOWSKA-MIKOLAJCZYK, M., KIME, D.E., SOCHA, M., EPLER, P. (2001b): Influence of mercury on computer analysed sperm motility of common carp *Cyprinus carpio* L., in vitro. *Archives of Polish Fisheries* 9:51-60.
- CIERESZKO, A. (2008): Chemical Composition of Seminal Plasma and its Physiological Relationship with Sperm Motility, Fertilizing Capacity and Cryopreservation Success in Fish. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G. (Szerk.) *Fish Spermatology*, Alpha Science International Ltd., Oxford, p. 215-240.
- CIERESZKO, A., DABROWSKI, K. (2000): In vitro effect of gossypol acetate on yellow perch (*Perca flavescens*) spermatozoa. *Aquatic Toxicology* 49: 181-187.
- CIERESZKO, A., DABROWSKI, K., MIMS, S.D. AND GLOGOWSKI, J. (2000a): Characteristics of sperm acrosin-like activity of paddlefish (*Polyodon spathula* Walbaum). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B – Biochemistry and Molecular Biology* 125: 197–203.
- CIERESZKO, A., GLOGOWSKI, J., DABROWSKI, K. (2000b): Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Szerk.) *Cryopreservation in Aquatic Species*, World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, p. 20-48.
- COLAK, A., YAMAMOTO, K. (1974): Ultrastructure of the Japanese eel spermatozoon. *Annotationes Zoologicae Japonenses* 47: 48–54.
- COPE, W.G., WIENER, J.G., ATCHISON, G.J. (1994): Hepatic cadmium, metal binding proteins and bioaccumulation in bluegills exposed to aqueous cadmium. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 553-562.
- COSSON, J., GROISON, A.L., SUQUET, M., FAUVEL, C., DREANNO, C., BILLARD, R. (2008): Marine fish spermatozoa: racing ephemeral swimmers. *Reproduction* 136: 277-294.
- COWARD, K., BROMAGE, N.R., HIBBITT, O., PARRINGTON, J. (2002): Gamete physiology, fertilization and egg activation in teleost fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 12: 33–58.
- DABROWSKI, K., CIERESZKO, A. (1996): Ascorbic acid protects against male infertility in a teleost fish. *Experientia* 52: 97-100.
- D'ADAMO, R., SPECCHIULLI, A., CASSIN, D., BOTTER, M., ZONTA, R., FABBROCINI, A. (2014): The effect of floods on sediment contamination in a microtidal coastal lagoon: the Lagoon of Lesina, Italy. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 297-309.

- DIETRICH, G.J., SZPYRKA, A., WOJTCZAK, M., DOBOSZ, S., GORYCZKO, K., ZAKOWSKI, L., CIERESZKO, A. (2005): Effects of UV irradiation and hydrogen peroxide on DNA fragmentation, motility and fertilizing ability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 64: 1809-1822.
- DIETRICH, G.J., DIETRICH, M., KOWALSKI, R.K., DOBOSZ, H.K., DEMIANOWICZ, W., GLOGOWSKI, J. (2010): Exposure of rainbow trout milt to mercury and cadmium alters sperm motility parameters and reproductive success. *Aquatic Toxicology* 97: 277-284.
- DIETRICH, G.J., CIERESZKO, A., KOWALSKI, R.K., RZEMIENIECKI, A., BOGDAN, E., DEMIANOWICZ, W., DIETRICH, M., KUJAWA, R., GLOGOWSKI, J. (2012): Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed sperm of Siberian sturgeon after a short-time exposure of fresh semen to mercury and cadmium. *Journal of Applied Ichthyology* 28: 973-977.
- DIETRICH, M.A., DIETRICH, G.J., HLIWA, P., CIERESZKO, A. (2011): Carp transferrin can protect spermatozoa against toxic effects of cadmium ions. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 153: 422-429.
- DINNEL, P.A., LINK, J.M., STOBBER, Q.J. (1987): Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 16:23-32.
- DINNEL, P.A., LINK, J.M., STOBBER, Q.J., LETOURNEAU, M.W., ROBERTS, W.E. (1989): Comparative Sensitivity of Sea Urchin Sperm Bioassays to Metals and Pesticides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 18: 748-755.
- DUFFUS, J.H. (2002): "Heavy metals"—A meaningless term? IUPAC Technical Report. *Pure and Applied Chemistry* 74(5): 793-807.
- EBRAHIMI, M. (2007): Effects of *in vivo* and *in vitro* Zinc and Cadmium Treatment on Sperm Steroidogenesis of the African Catfish *Clarias gariepinus*. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10(17): 2862-2867.
- EVENSON, D.P. (1999): Loss of livestock breeding efficiency due to uncompensable sperm nuclear defects. *Reproduction, Fertility and Development* 11(1): 1-16.
- EVENSON, D.P., JOST, L.K., MARSHALL, D., ZINAMAN, M.J., CLEGG, E., PURVIS, K. (1999): Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Human Reproduction* 14: 1039-1049.
- FABBROCINI, A., CASSIN, D., SANTUCCI, A., SCIROCCO, T., SPECCHIULLI, A., D'ADAMO, R. (2017): Early chemical and ecotoxicological responses of the Varano lagoon (SE Italy) to a flood event. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 144: 178-186.

- FABBROCINI, A., D'ADAMO, R., DEL PRETE, F., LANGELLOTTI, A.L., RINNA, F., SILVESTRI, F., SORRENTI, G., VITIELLO, V., SANSONE, G. (2012): Cryopreserved semen in ecotoxicological bioassays: Sensitivity and reliability of cryopreserved *Sparus aurata* spermatozoa. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 84: 293-298.
- FABBROCINI, A., D'ADAMO, R., DEL PRETE, F., MAURIZIO, D., SPECCHIULLI, A., OLIVEIRA, L.F.J., SILVESTRI, F., SANSONE, G. (2016): The sperm motility pattern in ecotoxicological tests. The CRYO-Ecotest as a case study. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 123: 53-59.
- FABBROCINI, A., DI STASIO, M., D'ADAMO, R. (2010): Computerized sperm motility analysis in toxicity bioassays: A new approach to pore water quality assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 73: 1588-1595.
- FERNANDES SILVA, E. VARELA JUNIOR, A.S., CARDOSO, T.F., STEFANELLO, F.M., KALB, A.C., MARTÍNEZ, P.E., CORCINI, C.D. (2016): Reproductive toxicology of 2,4 dinitrophenol in boar sperm. *Toxicology in Vitro* 35: 31-35.
- FLOHÉ, L. (1989): Determination of glutathione peroxidase. In: Miguel, J., Quintanilha, A.T., Weber, H. (Szerk.) *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine Vol III*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, p. 281-286.
- FOOTE, R.H. (1999): Fertility of rabbit sperm exposed *in vitro* to cadmium and lead. *Reproductive Toxicology* 13: 443-449.
- GAMBARDELLA, C., COSTA, E., PIAZZA, V., FABBROCINI, A., MAGI, E., FAIMALI, M., GARAVENTA, F. (2015): Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research* 111: 41-49.
- GAZO, I., LINHARTOVA, P., SHALIUTINA, A., HULAK, M. (2013): Influence of environmentally relevant concentrations of vinclozolin on quality, DNA integrity, and antioxidant responses of sterlet *Acipenser ruthenus* spermatozoa. *Chemico-Biological Interactions* 203: 377-385.
- GREGUS, Z. (2011): Részletes méregtan: Fémek okozta mérgezések. In: Gyires, K., Fürst, Zs. (Szerk.) *A farmakológia alapjai*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, p. 1120-1138.
- GRUIZ, K., HORVÁTH, B., MOLNÁR, M. (2001): *Környezettoxikológia*. Műegyetemi Kiadó, Budapest, 158 pp.
- HABAS, K., ANDERSON, D., BRINKWORTH, M. (2014): Development of an *in vitro* test system for assessment of male, reproductive toxicity. *Toxicology Letters* 225: 86-91.
- HABAS, K., ANDERSON, D., BRINKWORTH, M. (2016): Detection of phase specificity of *in vivo* germ cell mutagens in an *in vitro* germ cell system. *Toxicology* 353-354: 1-10.

- HAGEDORN, M., MCCARTHY, M., CARTER, V.L., MEYERS, S.A. (2012): Oxidative stress in zebrafish (*Danio rerio*) sperm. *PLoS ONE* 7: e39397.
- HANKS, J.H. (1949): Calcification of cell cultures in the presence of embryo juice and mammalian sera. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 71:328-34.
- HARRISON, R.A., DOTT, H.M., FOSTER, G.C. (1982): Bovine serum albumin, sperm motility, and the "dilution effect". *Journal of Experimental Zoology* 222(1): 81-88.
- HATEF, A., ALAVI, S.M.H., BUTTS, I.A.E., POLICAR, T., LINHART, O. (2011): Mechanism of action of mercury on sperm morphology, adenosine triphosphate content, and motility in *Perca fluviatilis* (Percidae; Teleostei). *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(4): 905-914.
- HATEF, A., ALAVI, S.M.H., GOLSHAN, M., LINHART, O. (2013): Toxicity of environmental contaminants to fish spermatozoa function *in vitro* – A review. *Aquatic Toxicology* 140-141: 134-144.
- HATEF, A., ALAVI, S.M.H., LINHARTOVA, Z., RODINA, M., POLICAR, T., LINHART, O. (2010): *In vitro* effects of Bisphenol A on sperm motility characteristics in *Perca fluviatilis* L. (Percidae; Teleostei). *Journal of Applied Ichthyology* 26: 696-701.
- HAYATI, A., GIARTI, K., WINARSIH, Y., AMIN, M.H.F. (2017): The Effect of Cadmium on Sperm Quality and Fertilization of *Cyprinus carpio* L. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology* 2: 45-50.
- HILL, A.J., TERAOKA, H., HEIDEMAN, W., PETERSON, R.E. (2005): Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. *Toxicological Sciences* 86(1): 6-19.
- HODGSON, E., LEBLANC, G.A., MEYER, S.A., SMART, R.C. (2004): Introduction to Biochemical and Molecular Methods in Toxicology. In: Hodgson, E. (Szerk.) *A Textbook of Modern Toxicology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, USA, p. 13-22.
- HOORNSTA, D., ANDERSSON, M.A., MIKOLA, R., SALKINOJA-SALONEN, M.S. (2003): A new method for *in vitro* detection of microbially produced mitochondrial toxins. *Toxicology in Vitro* 17: 745-751.
- HORN, P., ZSILINSZKY, S. (1993): Akvarisztika. Mezőgazda Kiadó, Budapest, 344 pp.
- HORVÁTH, A., VÁSÁRHELYI, J., SZENCI, O. (2006): A hímivarsejtek mozgása. Irodalmi összefoglaló. 2. rész: A mozgást vizsgáló módszerek fejlődése. *Magyar Állatorvosok Lapja* 128: 437-442.
- HORVÁTH, L. (2018): A ponty szaporodásbiológiája és szaporítása. In: Csorbai, B., Urbányi, B. (Szerk.) *A ponty (Cyprinus carpio L.) biológiája és tenyésztése*, Vármédia-Print Kft., Gödöllő, p. 35-64.

- HULAK, M., GAZO, I., SHALIUTINA, A., LINHARTOVA, P. (2013): In vitro effects of bisphenol A on the quality parameters, oxidative stress, DNA integrity and adenosine triphosphate content in sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 158: 64-71.
- HULATA, G., ROTHBARD, S. (1979): Cold storage of carp semen for short periods. *Aquaculture* 16: 267-269.
- HWANG, J., SUH, S.S., CHANG, M., YUN PARK, S., RYU, T.K., LEE, S., LEE, T.K. (2014): Effects of triclosan on reproductive parameters and embryonic development of sea urchin, *Strongylocentrotus nudus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 100: 148-152.
- INGERMANN, R.L. (2008): Energy Metabolism and Respiration in Fish Spermatozoa. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G. (Szerk.) *Fish Spermatology*, Alpha Science International Ltd., Oxford, p. 241-266.
- ISLAM, M.S., AKHTER, T. (2011): Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. *Advances in Life Sciences* 1(1): 11-19.
- JAMIESON, B.G.M. (1991): *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press.
- JEON, H.L., YI, J.S., KIM, T.S., OH, Y., LEE, H.J., LEE, M., BANG, J.S., KO, K., AHN, I.Y., KO, K., KIM, J., PARK, H.K., LEE, J.K., SOHN, S.J. (2017): Development of a Test Method for the Evaluation of DNA Damage in Mouse Spermatogonial Stem Cells. *Toxicological Research* 33(2): 107-118.
- 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.
- KHOSROWBEYGI, A., ZARGHAMI, N. (2008): Seminal plasma levels of free 8-isoprostane and its relationship with sperm quality parameters. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 23: 49-52.
- KIME, D.E. (1999): A strategy for assessing the effects of xenobiotics on fish reproduction. *The Science of the Total Environment* 225: 3-11.
- 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 of sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals. *Aquatic Toxicology* 36: 223-237.
- 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. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 130: 425-433.

- KIMMEL, C.B., BALLARD, W.W., KIMMEL, S.R., ULLMANN, B., SCHILLING, T.F. (1995): Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Developmental Dynamics* 203: 253-310.
- KOLLÁR, T. (2013): Különböző fluoridvegyületek hatása a zebradánió (*Danio rerio*) sperma minőségére. Diplomadolgozat. Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet, Halgazdálkodási Tanszék, Gödöllő
- KOVENDAN, K., VINCENT, S., JANARTHANAN, S., SARAVANAN, M. (2013): Expression of metallothionein in liver and kidney of freshwater fish *Cyprinus carpio var. communis* (Linn) exposed to arsenic trioxide. *American Journal of Scientific and Industrial Research* 4(1): 1–10.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97: 2052–2057.
- KUSTER, C (2005): Sperm concentration determination between hemacytometric and CASA systems: Why they can be different. *Theriogenology* 64: 614-617.
- KUTLUYER, F., BENZER, F., ERISIR, M., ÖGRET MEN, F., INANAN, B.E. (2016): The *in vitro* effect of cypermethrin on quality and oxidative stress indices of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 128: 63-67.
- KUTLUYER, F., ERISIR, M., BENZER, F., ÖGRET MEN, F., INANAN, B.E. (2015): The *in vitro* effect of Lambda-cyhalothrin on quality and antioxidant responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* spermatozoa. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40: 855-860.
- 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.
- LAHNSTEINER, F., BERGER, B., GRUBINGER, F., WEISMANN, T. (2005): The effect of 4-nonylphenol on semen quality, viability of gametes, fertilization success, and embryo and larvae survival in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 71: 297-306.
- LAHNSTEINER, F., MANSOUR, N., BERGER, B. (2004): The effect of inorganic pollutants on sperm motility of some freshwater teleosts. *Journal of Fish Biology* 65: 1283-1298.
- LAHNSTEINER, F., PATZNER, R. (2008): Sperm Morphology and Ultrastructure in Fish. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, G. (Szerk.) *Fish Spermatology*, Alpha Science International Ltd., Oxford, p. 2-61.

- LEHEL, J., LACZAY, P. (2011): Toxikológia. Egyetemi jegyzet. Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar, Budapest, 268 pp.
- LELE, Z., KRONE, P.H. (1996): The zebrafish as a model system in developmental, toxicological and transgenic research. *Biotechnology Advances* 14(1): 57-72.
- LERA, S., MACCHIA, S., PELLEGRINI, D. (2006): Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. *Environmental Monitoring and Assessment* 122: 101-109.
- LEUNG, L.K.P., JAMIESON, B.G.M. (1991): Live preservation of fish gametes. In: Jamieson, B.G.M. (Szerk.) *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa*. Cambridge University Press, p. 245–295.
- LI, Z.H., LI, P., DZYUBA, B., RANDAK, T. (2010a): Influence of environmental related concentrations of heavy metals on motility parameters and antioxidant responses in sturgeon sperm. *Chemico-Biological Interactions* 188: 473-477.
- LI, Z.H., LI, P., RODINA, M., RANDAK, T. (2010b): Effect of human pharmaceutical Carbamazepine on the quality parameters and oxidative stress in common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa. *Chemosphere* 80: 530-534.
- LI, Z.H., LI, P., RODINA, M., RANDAK, T. (2010c): Evaluating the function of calcium antagonist on the Cd-induced stress in sperm of Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*. *Aquatic Toxicology* 100: 373-375.
- LINHART, O., SLECHTA, V., SLAVIK, T. (1991): Fish semen composition and biochemistry. *Bulletin of the Institute of Zoology, Academia Sinica* 16: 285-311.
- LINHART, O., RODINA, M., GELA, D., KOCOUR, M., RODRIGUEZ, M. (2004): Improvement of common carp artificial reproduction using enzyme for elimination of egg stickiness. *Aquatic Living Resources* 16: 450-456.
- LINHARTOVA, P., GAZO, I., SHALIUTINA, A., HULAK, M. (2013): The *in vitro* effect of duroquinone on functional competence, genomic integrity, and oxidative stress indices of sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Toxicology In Vitro* 27: 1617-1619.
- LINHARTOVA, P., GAZO, I., SHALIUTINA-KOLESOVA, A., HULAK, M., KASPAR, V. (2014): Effects of Tetrabrombisphenol A on DNA Integrity, Oxidative Stress, and Sterlet (*Acipenser ruthenus*) Spermatozoa Quality Variables. *Environmental Toxicology* 10.1002/tox.21953.
- LIU, Q.H., LI, J., ZHANG, S.C., XIAO, Z.Z., DING, F.H., YU, D.D., XU, X.Z. (2007): Flow cytometry and ultrastructure of cryopreserved red seabream (*Pagrus major*) sperm. *Theriogenology* 67: 1168-1174.

- LIVINGSTONE, D.R. (2003): Oxidative stress in aquatic organisms in relation to pollution and aquaculture. *Revue de Médecine Vétérinaire* 154: 427-430.
- LOSSO, C., ARIZZI NOVELLI, A., PICONE, M., MARCHETTO, D., PANTANI, C., GHETTI, P.F., VOLPI GHIRARDINI, A. (2007): Potential role of sulfide and ammonia as confounding factors in elutriate toxicity bioassays with early life stages of sea urchins and bivalves. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 66(2): 252-257.
- LOSSO, C., ARIZZI NOVELLI, A., PICONE, M., VOLPI GHIRARDINI, A., GHETTI, P.F., RUDELLO, D., UGO, P. (2004): Sulfide as a confounding factor in toxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: comparison with chemical analysis data. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(2): 396-401.
- MANZO, S., BUONO, S., CREMISINI, C. (2006): Toxic Effects of Irgarol and Diuron on Sea Urchin *Paracentrotus lividus* Early Development, Fertilization, and Offspring Quality. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51(1): 61-68.
- MARCEL, J. (1981): Contrôle de la reproduction et gestion des gamètes de quelques espèces de poissons téléostéens. Diplôme de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, 132 pp, Lyon.
- MARCO-JIMÉNEZ, F., PÉREZ, L., CASTRO, M.P., GARZÓN, D.L., PENARANDA, D.S., VICENTE, J.S., JOVER, M., ASTURIANO J.F. (2006): Morphometry characterisation of European eel spermatozoa with computer-assisted spermatozoa analysis and scanning electron microscopy. *Theriogenology* 65(7): 1302-10.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., DIOGO, P., BEIRÃO, J., DINIS, M.T., CABRITA, E. (2012a): Sperm lipid peroxidation is correlated with differences in sperm quality during the reproductive season in precocious European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) males. *Aquaculture* 358–359: 246-252.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., DIOGO, P., DINIS, M.T., HERRÁEZ, M.P., SARASQUETE, C., CABRITA, E. (2012b): Incorporation of ascorbic acid and α -tocopherol to the extender media to enhance antioxidant system of cryopreserved seabass sperm. *Theriogenology* 77: 1129-1136.
- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., DIOGO, P., DINIS, M.T., SOARES, F., SARASQUETE, C., CABRITA, E. (2013a): Effect of two sulfur-containing amino acids, taurine and hypotaurine in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) sperm cryopreservation. *Cryobiology* 66: 333-338.

- MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., DINIS, M.T., SOARES, F., PACCHIARINI, T., SARASQUETE, C., CABRITA, E. (2013b): A nutritional approach to enhance the antioxidant system of fish teleosts. In: Martínez-Páramo, S., Oliveira, C.C.V., Dinis, M.T. (Szerk.), *4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Albufeira, Portugal*, book of abstracts p. 120-121.
- MASSAR, B., DEY, S., DUTTA, K. (2011): An Electron Microscopic Analysis on the Ultra Structural Abnormalities in Sperm of the Common Carp *Cyprinus carpio* L. Inhabiting a Polluted Lake, Umiam (Meghalaya, India). *Microscopy Research and Technique* 74: 998-1005.
- MATTEI, C., MATTEI, X. (1978): La spermatogénese d'un poisson téléostéen *Lepadogaster lepadogaster*. La spermatide. *Biologie Cellulaire* 32: 257–266.
- MATTEI, C., MATTEI, V. (1984): Spermatozoides biflagellés chez un poisson téléostéen de la famille de Apogonidae. *Journal of Ultrastructure Research* 88: 223-228.
- MÉZES, M. (Szerk.) (2009): Takarmánytoxikológia. Egyetemi jegyzet. Szent István Egyetem, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Gödöllő, 99 pp.
- MORISAWA, M., MORISAWA, S. (1990): Acquisition and initiation of sperm motility. In: Gagnon, C. (Szerk.) *Controls of Sperm Motility: Biological and Clinical Aspects*, CRC Press, Boca Raton, p. 137–152.
- MOTTET, N.K., LANDOLT, M.L. (1987): Advantages of using aquatic animals for biomedical research on reproductive toxicology. *Environmental Health Perspectives* 71: 69-75.
- MURADO, M.A., PRIETO, M.A. (2014): Oversimplification and overstandardization in biological methods: sperm bioassays in ecotoxicology as a case of study and a proposal for their reformulation. *The Scientific World Journal* 2014: 936202.
- NAGAHAMA, Y. (1983): The functional morphology of teleost gonads. In: Hoar, H.S., Randall, D.J., Donaldson, E.M. (Szerk.) *Reproduction – Endocrine Tissues and Hormones*. Academic Press, New York, p. 223–275.
- NAGY, SZ., KAKASI, B., BERCSÉNYI, M. (2016): Flow cytometric detection of oxidative DNA damage in fish spermatozoa exposed to cadmium. *Acta Veterinaria Hungarica* 64: 120-124.
- NISHA, J.C., RAJA JEYA SEKAR, R., CHANDRAN, R. (2016): Acute effect of chromium toxicity on the behavioral response of zebra fish *Danio rerio*. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* 6(2): 6-14.
- OLIVA, R. (2006): Protamines and male infertility. *Human Reproduction Update* 12: 417–435.

- OLSEN, A. K., LINDEMAN, B., WIGER, R., DUALE, N., BRUNBORG, G. (2005): How do male germ cells handle DNA damage? *Toxicology and Applied Pharmacology* 207: 521–531.
- PAGANO, G., ESPOSITO, A., GIORDANO, G.G., HAGSTRÖM, B.E. (1978): Embryotoxic and teratogenic effects of styrene derivatives on sea urchin development. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* 4(2): 136-141.
- PERCHEC, G., COSSON, J., ANDRE, F., BILLARD, R. (1995a): Degradation of the quality of carp sperm by urine contamination during stripping. *Aquaculture* 129: 135-136.
- PERCHEC, G., JEULIN, C., COSSON, J., ANDRÉ, F., BILLARD, R. (1995b): Relationship between sperm ATP content and motility of carp spermatozoa. *Journal of Cell Science* 108: 747-753.
- PÉREZ-CEREZALES, S., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., CABRITA, E., MARTÍNEZ-PASTOR, F., DE PAZ, P., HERRÁEZ, M.P. (2009): Evaluation of oxidative DNA damage promoted by storage in sperm from sex-reversed rainbow trout. *Theriogenology* 71: 605-613.
- PÉREZ-CEREZALES, S., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., BEIRÃO, J., HERRÁEZ, M.P. (2010a): Evaluation of DNA damage as a quality marker for rainbow trout sperm cryopreservation and use of LDL as cryoprotectant. *Theriogenology* 74: 282-289.
- PÉREZ-CEREZALES, S., MARTÍNEZ-PÁRAMO, S., BEIRÃO, J., HERRÁEZ, M.P. (2010b): Fertilization capacity with rainbow trout DNA damaged sperm and embryo developmental success. *Reproduction* 139: 989-997.
- REINARDY, H.C., SKIPPINS, E., HENRY, T.B., JHA, A.N. (2013): Assessment of DNA damage in sperm after repeated non-invasive sampling in zebrafish *Danio rerio*. *Journal of Fish Biology* 82: 1074-1081.
- ROCHA, S., STREIT JUNIOR, D.P., MARQUES, L.S., VARELA JUNIOR, A.S., CORCINI, C.D., HOSHIBA, M.A. (2017): Toxic effects of mercury chloride on silver catfish (*Rhamdia quelen*) spermatozoa. *Aquaculture Research* 10.1111/are.13543
- ROSETY, M., ORDONEZ, F.J., ROSETY-RODRÍGUEZ, M., ROSETY, J.M., ROSETY, I. (2003): *In vitro* acute toxicity of anionic surfactant linear alkylbenzene sulphonate (LAS) on the motility of gilthead (*Sparus aurata* L.) sperm. *Histology and Histopathology* 18: 475-478.
- RURANGWA, E., ROELANTS, I., HUYSKENS, G., EBRAHIMI, M., KIME, D.E., OLLEVIER, F. (1998): The minimum effective spermatozoa: egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. *Journal of Fish Biology* 53: 402-441.

- RURANGWA, E., BIEGNIIEWSKA, A., SLOMINSKA, E., SKORKOWSKI, E.F., OLLEVIER, F. (2002): Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility. *Comparative Biochemistry and Physiology- Part C* 131: 335-344.
- 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* 234: 1-28.
- RUSSEL, W.M.S., BURCH, R.L. (1959): The Principles of Humane Experimental Technique. *Universities Federation for Animal Welfare*, Wheathampstead (UK), 238 pp.
- SAACKE, R.G. (2008): Sperm morphology: Its relevance to compensable and uncompensable traits in semen. *Theriogenology* 70(3): 473-478.
- SAAD, A., BILLARD, R. (1987): Spermatozoa production and volume of semen collected after hormonal stimulation in the carp, *Cyprinus carpio*. *Aquaculture* 65: 67-77.
- SAAD, A., BILLARD, R., THERON, M.C., HOLLEBECQ, M.G. (1988): Short-Term Preservation of Carp (*Cyprinus carpio*) Semen. *Aquaculture* 71: 133-150.
- SALIN, J.T., SALKINOJA-SALONEN, M., SALIN, P.J., NELO, K., HOLMA, T., OHTONEN, P., SYRJALA, H. (2017): Building-related symptoms are linked to the in vitro toxicity of indoor dust and airborne microbial propagules in schools: A cross-sectional study. *Environmental Research* 154: 234-239.
- SAROSIEK, B., PIETRUSEWICZ, M., RADZIWOŃIUK, J., GLOGOWSKI, J. (2009): The effect of copper, zinc, mercury and cadmium on some enzyme activities in the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Reproductive Biology* 9(3): 295-301.
- SHALIUTINA, O., SHALIUTINA-KOLESOVA, A., LEBEDA, I., RODINA, M., GAZO, I. (2017): The *in vitro* effect of nonylphenol, propranolol, and diethylstilbestrol on quality parameters and oxidative stress in sterlet (*Acipenser ruthenus*) spermatozoa. *Toxicology in Vitro* 43: 9-15.
- SHALIUTINA-KOLESOVA, A., GAZO, I., COSSON, J., LINHART, O. (2014): Protection of common carp (*Cyprinus carpio* L.) spermatozoa motility under oxidative stress by antioxidants and seminal plasma. *Fish Physiology and Biochemistry* 40(6): 1771-1781.
- SHALIUTINA-KOLESOVA, A., KOTAS, P., STERBA, J., RODINA, M., DZUYBA, B., COSSON, J., LINHART, O. (2016): Protein Profile of Seminal Plasma and Functionality of Spermatozoa During the Reproductive Season in the Common Carp (*Cyprinus carpio*) and Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction & Development* 83(11): 968-82.
- SHAWN, T.L., BROWN, V.M. (1971): Heavy Metals and the Fertilization of Rainbow Trout Eggs. *Nature* 230: 251.

- SNEED, K.E., CLEMENS, H.P. (1956): Survival of fish sperm after freezing and storage at low temperatures. *The Progressive Fish Culturist* 18: 99-103.
- SÖVÉNYI, J., SZAKOLCZAI, J. (1993): Studies on the toxic and immunosuppressive effects of cadmium on the common carp. *Acta Veterinaria Hungarica* 41(3-4): 415-426.
- SZABÓ, T., HORVÁTH, L., URBÁNYI, B. (2000): A halak szaporodásbiológiája. In: Horváth, L. (Szerk.) *Halbiológia és haltenyésztés*, Mezőgazda Kiadó, Budapest, p. 168-205.
- TAN, E., YANG, H., TIERSCH, T.R. (2010): Determination of Sperm Concentration for Small-Bodied Biomedical Model Fishes by Use of Microspectrophotometry. *Zebrafish* 7(2): 233-240.
- VAN DER OOST, R., BEYER, J., VERMEULEN, N.P.E. (2003): Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 13: 57-149.
- VAN LOOK, K.J.W., KIME, D.E. (2003): Automated sperm morphology analysis in fishes: the effect of mercury on goldfish sperm. *Journal of Fish Biology* 63: 1020-1033.
- VICENTE-CARRILLO, A., EDEBERT, I., GARSIDE, H., COTGREAVE, I., RIGLER, R., LOITTO, V., MAGNUSSON, K.E., RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. (2015): Boar spermatozoa successfully predict mitochondrial modes of toxicity: Implications for drug toxicity testing and the 3R principles. *Toxicology in Vitro* 28: 582-591.
- VOLPI GHIRARDINI, A., ARIZZI NOVELLI, A. (2001): A Sperm Cell Toxicity Test Procedure for the Mediterranean Species *Paracentrotus Lividus* (Echinodermata: Echinoidea). *Environmental Technology* 22(4): 439-445.
- VOLPI GHIRARDINI, A., ARIZZI NOVELLI, A., LIKAR, B., POJANA, G., GHETTI, P.F., MARCOMINI, A. (2001): Sperm cell toxicity test using sea urchin *Paracentrotus lividus* Lamarck (Echinodermata: Echinoidea): sensitivity and discriminatory ability toward anionic and nonionic surfactants. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(3): 644-651.
- WALLACE, R.A. (1978): Oocyte growth in nonmammalian vertebrates. In: Jones, R.E. (Szerk.) *The vertebrate ovary*, Plenum Press, New York, p. 469-502.
- WALLACE, R.A., SELMAN, K. (1981): Cellular and Dynamic Aspects of Oocyte Growth in Teleosts. *American Zoologist* 21: 325-343.
- WANG, H., LIANG, Y., LI, S., CHANG, J. (2013): Acute Toxicity, Respiratory Reaction, and Sensitivity of Three Cyprinid Fish Species Caused by Exposure to Four Heavy Metals. *PLoS ONE* (8)6: e65282.

- WILSON-LEEDY, J.G., KANUGA, M.K., INGERMANN, R.L. (2009): Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility. *Theriogenology* 71: 1054-1062.
- WONG, M.H., LAU, W.M., TONG, T.Y., LIU, W.K., LUK, K.C. (1982): Toxic effects of chromium sulphate on the common carp, *Cyprinus carpio*. *Toxicology Letters* 10: 225-232.
- WOYNAROVICH, E. (1962): Hatching of carp eggs in „Zuger” glasses, and breeding of carp larvae until an age of 10 days. *Bamidgeh* 14: 38-46.
- YANG, H., CARMICHAEL, C., VARGA, Z.M., TIERSCH, T.R. (2007): Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. *Theriogenology* 68(2): 128-136.
- YOUSEF, M.I., KAMEL, K.I., EL-GUENDI, M., EL-DEMERDASH, F.M. (2007): An *in vitro* study on reproductive toxicity of aluminium chloride on rabbit sperm: The protective role of some antioxidants. *Toxicology* 239: 213-223.
- YURDAKOK, B., TEKIN, K., DASKIN, A., FILAZI, A. (2015): Effects of Polychlorinated Biphenyls 28, 30 and 118 on Bovine Spermatozoa *In Vitro*. *Reproduction in Domestic Animals* 50: 41-47.
- ZHANG, L., WANG, S., CHEN, W., HU, B., ULLAH, S., ZHANG, Q., LE, Y., CHEN, B., YANG, P., BIAN, X., LIU, Y., CHEN, Q., LIN, J., GAO, C., HU, J. (2014): Fine structure of zebrafish (*Danio rerio*) spermatozoa. *Pakistan Veterinary Journal* 34(4): 518-521.
- ZHOU, B., LIU, W., SIU, W.H.L., O'TOOLE, D., LAM, P.K.S., WU, R.S.S. (2006): Exposure of spermatozoa to duroquinone may impair reproduction of the common carp (*Cyprinus carpio*) through oxidative stress. *Aquatic Toxicology* 77: 136-142.
- A Bizottság jelentése a Tanácsnak és az Európai Parlamentnek: Hetedik jelentés az Európai Unió tagállamaiban kísérleti és egyéb tudományos célra használt állatok számára vonatkozó statisztikáról, Brüsszel, 2013.12.5., COM(2013) 859 final
- Sperm Cell Toxicity Tests Using the Sea Urchin (*Arbacia punctulata*). Environmental Protection Agency, United States, 2009.
- OECD Series on Testing and Assessment, Number 54: Current approaches in the statistical analysis of ecotoxicology data: a guidance to application (ENV/JM/MONO(2006)18).

M2. A halak tartásához használt rendszervízben található fontosabb ionok koncentrációi

	Zebradánió rendszervíz	Ponty rendszervíz
NO ₃ ⁻	33 mg/L	23 mg/L
Cl ⁻	114 mg/L	29 mg/L
OH ⁻	0 mM/L	0 mM/L
CO ₃ ²⁻	0 mM/L	0 mM/L
HCO ₃ ²⁻	0,4 mM/L	4,9 mM/L
Na	83,8 mg/L	91 mg/L
K	4,07 mg/L	2,3 mg/L
Ca	4,36 mg/L	33,04 mg/L
Cr	kimutatási határ alatt	kimutatási határ alatt
Zn	kimutatási határ alatt	kimutatási határ alatt
Pb	kimutatási határ alatt	kimutatási határ alatt
Co	kimutatási határ alatt	kimutatási határ alatt
Cd	kimutatási határ alatt	kimutatási határ alatt
Ni	kimutatási határ alatt	kimutatási határ alatt
Mn	0,157 mg/L	0,157 mg/L
Fe	kimutatási határ alatt	kimutatási határ alatt
Cu	kimutatási határ alatt	kimutatási határ alatt
Hg	kimutatási határ alatt	kimutatási határ alatt
As	0,005 mg/L	0,0065 mg/L

A vízminták analízise az MSZ 448/15-82, MSZ EN ISO 9963-2:1998, MSZ 448/11-86, MSZ EN ISO 11885:2009, valamint MSZ 1484-3:2006 (5. fejezet) szabványok iránymutatásai alapján történt.

M3. A kísérletek során használt törzsoldatok koncentrációja és azok ozmolalitása

	Koncentráció (mg/L)	Ozmolalitás (mOsm/kg)
Cr³⁺	2000	
Cr(NO ₃) ₃ × 9 H ₂ O	15385	535
Zn²⁺	400	
Zn(NO ₃) ₂ × 6 H ₂ O	1820	394
Cu²⁺	100	
Cu(NO ₃) ₂ × 3 H ₂ O	381	445
Cd²⁺	100	
Cd(NO ₃) ₂ × 4 H ₂ O	247	420
Ni²⁺	2400	
Ni(NO ₃) ₂ × 6 H ₂ O	11893	521
Hg²⁺	40	
Hg(NO ₃) ₂ × H ₂ O	68	422
As³⁺	400	
As ₂ O ₃	528	491

A nehézfém vegyületeket nem tartalmazó immobilizáló oldat ozmolalitása 420 mOsm/kg volt.

10. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Ezúton szeretnék köszönetet mondani mindazoknak, akik közvetve, vagy közvetlenül hozzájárultak doktori munkámhoz, és akik nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

Elsősorban köszönettel tartozom **Dr. Urbányi Béla** tanszékvezetőnknek, aki lehetőséget biztosított ahhoz, hogy vizsgálataimat a Szent István Egyetem Halgazdálkodási Tanszékén elvégezhessem, és aki a kísérleteim elvégzéséhez szükséges anyagi háttérrel megteremtette. Köszönöm témavezetőimnek, **Dr. Horváth Ákosnak** és **Dr. Csenki-Bakos Zsoltnak**, hogy tanácsaikkal és szakmai tapasztalatukkal folyamatosan segítették munkámat, és kérdéseimmel bármikor fordulhattam hozzájuk. Köszönet illeti közvetlen kollégáimat, **Dr. Jelena Lujic**-ot, **Zoran Marinovic**-ot, kiváltképp pedig **Dr. Kása Esztert**, akik kísérleteim kivitelezésében mindvégig segítségemre voltak, valamint segítettek disszertációm végső formába öntésében.

Szeretném köszönetemet kifejezni a zebradániós laborban dolgozó volt és jelenlegi kollégáknak, elsősorban **Gazsi Gyöngyinek**, **Garai Edinának** és **Berta Izabella Robertának**, hogy a kísérleteim elvégzéséhez szükséges zebradániókat a rendelkezésemre bocsátották, és lehetőséget biztosítottak a vizsgálataim elvégzéséhez. Köszönöm továbbá **Dr. Csorbai Baláznak** a fáradhatatlan munkáját az intenzív haltartó rendszer fenntartásában, ezáltal a pontyok nevelésében és tartásában nyújtott segítségét.

Köszönettel tartozom **Ivánovics Bencének** és **Dr. Ferincz Árpádnak** az eredményeim statisztikai kiértékelésében nyújtott segítségéért. Köszönöm továbbá **Dr. Hegyi Árpádnak**, valamint **Dr. Horváth Márknak** a vízminták analitikai elemzésében nyújtott önzetlen segítségét.

A doktori munkámat és a kísérleteim kivitelezését az alábbi **pályázatok** támogatták:

- a Halászati Operatív Program III. tengelye (“Európai Halászati Alap: a megújuló halászatért”- az Európai Unió és Magyarország támogatásával),
- 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*),
- az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 számú projekt, az Európai Unió támogatásával és az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával,
- az Emberi erőforrások Minisztériuma ÚNKP-17-3 kódszámú Új Nemzeti Kiválósági Programja,

- „Fogyasztói igényekhez igazodó, gazdaságilag jelentős haszonhalaink (harcsa, ponty, süllő) genetikai erőforrásainak és tenyésztés-technológiájának innovatív fejlesztése – GOODFISH” c. GINOP pályázat (GINOP-2.3.2-15-2016-00025),
- „A budapesti várostérség tisztított és nem tisztított kommunális szennyvizeiben található egyes EDC szermaradványok vízminőségi, ökológiai és élelmiszerbiztonsági kockázatai és kockázatcsökkentő fejlesztések” c. NVKP pályázat (NVKP_16-1-2016-0003),
- „Új kockázatkezelési modellrendszer fejlesztése a víz- és élelmiszerbiztonság növelése érdekében a haltermékvonalon” c. NVKP pályázat (NVKP_16-1-2016-0023).

Nem utolsósorban pedig köszönettel tartozom **Családomnak** és **Páromnak** a folyamatos biztatásért és támogatásért.