



**A HALSPERMA VIZSGÁLATÁRA ALAPOZOTT TOXIKOLÓGIAI
TESZTRENSZEREK KIALAKÍTÁSA**

Doktori értekezés tézisei

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

1. A munka előzményei, a kitűzött célok

A tudományos célból évente felhasznált gerinces állatok számát 100 millióra becsülik. 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.

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, ezért ezen irányelvekben a zebradánió (*Danio rerio*), valamint a ponty (*Cyprinus carpio*) fel vannak tüntetve a kísérletekhez javasolt modell szervezetekként. A halsperma pedig a könnyen, gyorsan és objektíven mérhető paraméterei 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*

in vitro sejtkultúrákkal 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 másik pedig a kísérletek során vizsgált végpontok között mutatkozott. A halsperma motilitási paramétereinek toxikológiai célú vizsgálatával kapcsolatban is számos publikáció született eddig, azonban ezek sem egységesek: az ugyanazon fajban és toxikus vegyületekkel elvégzett vizsgálatok eredményei olykor ellentmondásosak, az eltérő kísérleti körülmények és technikai részletek miatt. Érhetik továbbá 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.

1.1 Célkitűzések

Doktori munkám során célul tűztem ki gyors, egyszerűen kivitelezhető és megismételhető, a halsperma vizsgálatán alapuló sztereotip *in vitro* toxikológiai tesztrendszerek 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, nikkél, 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 (EC₅₀-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. Anyag és módszer

2.1 A sperma fejése, hígítása és kitettsége

Zebradánió esetében több egyedtől származó, kevert spermamintákkal dolgoztam. A fejés során 10 μL spermát gyűjtöttem 50 μL pontyféle immobilizáló oldatba. Ponty fajban egyedi, független mintákon végeztem el a kísérleteket. A kísérlet előtt a minták minőségét – ahogy a motilitásvizsgálati kísérletek során is – Számítógépes Spermavizsgáló Rendszerrel ellenőrizem. A tesztelendő nehézfém-koncentrációk meghatározása előzetes dózistartomány-kereső vizsgálatok alapján történt, melyek a következőek voltak a két fajban: 50, 100, 150, 200 mg/L Cr^{3+} és Zn^{2+} esetében, 1, 5, 25, 50 mg/L Cu^{2+} és Cd^{2+} esetében, 600, 800, 1000, 1200 mg/L Ni^{2+} esetében, valamint 0,5, 1, 2,5, 5 mg/L Hg^{2+} esetében. Egyedül az As^{3+} esetében alkalmaztam eltérő koncentrációkat a két fajban: zebradánió-spermán 50, 100, 150 és 200 mg/L-es koncentrációkat teszteltem, míg ponty esetében 1, 5, 25 és 50 mg/L-t. Ponty esetében a frissen lefejt egyedi mintából 10 μL -t először tovább hígítottam 50 μL immobilizáló oldatban, hogy elérjem a zebradániónál is alkalmazott 6 \times -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 \times -es hígítás), így elérve a végső vizsgálati koncentrációkat. 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.

2.2 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. A spermavizsgálat során, zebradánió esetében 2,5 μL rendszervízbe 1 μL toxikus anyaggal hígított spermát juttattam, míg pontyspermában nagyobbfokú hígításra volt szükség, így 25 μL rendszervízbe 0,5 μL nehézfémnek kitett spermát pipettáztam. Mindkét halfajban a kísérleteket 5 független mintával végeztem el: zebradánió esetében 5 különböző, több egyedről származó kevert spermamintát használtam fel, míg ponty esetében 5 különböző egyedről származó, független spermamintán végeztem el a kísérleteimet.

2.3 A termékenyülés, valamint az embriogenezis vizsgálata zebradánióban

A termékenyítési kísérletek során az ikratételekre a 30, valamint 120 perces nehézfém-expozíciónak kitett, 20 μL immobilizált spermát juttattam, melyet kb. 1 mL hozzáadott rendszervízzel aktiváltam. 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.

A kísérlet végpontjai a termékenyülési százalék (%), valamint az embriók 48 órás korban vizsgált túlélése a termékenyült ikrák számához viszonyítva (%) voltak. A termékenyülési százalék megállapítása a termékenyítést követően 24 órával történt. Ezenkívül vizsgáltam a különböző deformitásokat és fejlődésbeli

rendellenességeket 24 óra és 48 óra elteltével is, mely során az alábbi rendellenességek kialakulását vizsgáltam: sziködéma, perikardiális ödéma, fej- és szemfejlődési rendellenességek, farok- és gerinctorzulás, dezintegrált test. Kísérleteimet minden nehézfém és expozíciós idő esetében 3 ismétlésben végeztem el.

3. Eredmények

3.1 Toxikológiai célú spermavizsgálat

A toxikológiai célú spermavizsgálat során zebraadánió 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 legelőször 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 zebraadánió, 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 zebraadánió-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.

3.2 A termékenyülés, valamint az embriogenezis vizsgálata zebradánióban

Kísérleteim során két nehézfém, a Cd^{2+} és Zn^{2+} vizsgálata során nem tapasztaltam szignifikáns hatást a sperma termékenyítőképességére az alkalmazott koncentrációk és expozíciós idők mellett. További négy nehézfém, a Cr^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} és Hg^{2+} vizsgálata során az alkalmazott koncentrációk szignifikánsan csökkentették a sperma termékenyítőképességét, azonban az alkalmazott expozíciós idők hatása nem volt szignifikáns. Egyedül az As^{3+} esetében volt hatással a termékenyítőképességre a koncentráció, valamint az expozíciós idő is. Az embriók 48 órás korban vizsgált túlélése és az embrionális deformitások kialakulásának aránya (24 és 48 órás korban) nem különbözött szignifikánsan a kontrolltól egyik nehézfém-kezelés esetében sem.

4. Új tudományos eredmények

1. Kidolgoztam egy halsperma vizsgálatán alapuló *in vitro* toxikológiai tesztrendszert, 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 nehézfémrel terhelt spermával termékenyítve az embrionális deformitások kialakulásának aránya és a túlélés nem változik szignifikánsan az embriók 48 óráig.

5. Következtetések és javaslatok

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 dózishatás, 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* tesztrendszerrel 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 percig 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 kitétségét követő vizsgálatok végpontjait összevetve nehézfémeként eltérő, hogy a sperma motilitási paraméterei, vagy pedig a termékenyítőképessége reagált-e érzékenyebben az expozícióra. A Cd²⁺ és Zn²⁺ 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-kitétségét, úgyhogy ennek vizsgálata CASA-rendszer hiányában indokolt lehet.

5.1 Javaslatok

Eredményeim alapján a következő javaslatokat teszem:

- Javaslom a zebradánió- 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. A szerzőnek az értekezés témaköréhez kapcsolódó publikációi

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

Kollár, T., Kása, E., Ferincz, Á., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Z., Horváth, Á. (2018): Development of an *in vitro* toxicological test system based on zebrafish (*Danio rerio*) sperm analysis. Environmental Science and Pollution Research 25(15): 14426-14436., doi: 10.1007/S11356-018-1613-2.

Kollár, T., Kása, E., Csorbai, B., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Zs., Horváth, Á. (2018): *In vitro* toxicology test system based on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm analysis. Fish Physiology and Biochemistry, bíráló alatt.

Kollár, T., Gazsi, G., Kása, E., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Z., Horváth, Á. (2018): Investigation of embryogenesis following fertilization with sperm exposed by heavy metals, in zebrafish (*Danio rerio*). Environmental Science and Pollution Research, bíráló alatt.

Konferencia kiadványban megjelent közlemények:

Kollár, T., Kása, E., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Z., Horváth, Á.: Investigation of embryogenesis followed fertilization with sperm exposed by heavy metals, in zebrafish (*Danio rerio*). VIII International Conference "Water & Fish", Belgrád, Szerbia, 2018. június 13-15., kivonat 282-284.p.

Kollár, T., Kása, E., Csenki-Bakos, Z., Horváth, Á.: Investigation of embryogenesis following fertilization with sperm exposed by heavy metals, in zebrafish (*Danio rerio*). Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, Budapest, 2018. március 28-29., kivonat 71.p.

Kollár, T.: Embriogenezis vizsgálata nehézfémekkel terhelt spermával történő termékenyítés során, zebradánió fajban. SZIE Kiváló Tehetségei konferencia, Gödöllő, 2018. február 9., kivonat 61.p.

Kollár, T., Kása, E., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Z., Horváth, Á.: Embriogenezis vizsgálata nehézfémekkel terhelt spermával történő termékenyítés során, zebradánió (*Danio rerio*) fajban. Professzorok az Európai Magyarországiért Egyesület XV. nemzetközi PhD-konferenciája, Budapest, 2017. november 8., kivonat 2: 28-34.p.

Kollár, T., Kása, E., Ferincz, Á., Csorbai, B., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Z., Horváth, Á.: *In vitro* toxicology test system based on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm analysis. 6th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Vodnany, Csehország, 2017. szeptember 4-7., kivonat 91.p.

Kollár, T., Kása, E., Csenki-Bakos, Z., Ferincz, Á., Urbányi, B., Horváth, Á.: Development of an *in vitro* toxicological test system based on zebrafish (*Danio rerio*) sperm analysis. 10th European Zebrafish Meeting, Budapest, 2017. július 3-7., kivonat 369.p.

Kollár, T., Kása, E., Ferincz, Á., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Z., Horváth, Á.: Zebradánió (*Danio rerio*) sperma vizsgálatán alapuló *in vitro* toxikológiai tesztrendszer. Magyar Laborállat-tudományi Egyesület Nemzetközi Tudományos Ülése, Budapest, 2017. május 25.

Kollár, T., Kása, E., Ferincz, Á., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Z., Horváth, Á.: A halsperma vizsgálatára alapozott toxikológiai tesztrendszerek kidolgozása. Professzorok az Európai Magyarországiért Egyesület XIV. PhD-konferenciája, nemzetközi konferencia, Budapest, 2017. április 6., kivonat 29-35.p.

Kollár, T., Csenki, Z., Kovács, R., Bernáth, G., Horváth, Á.: Különböző fluoridvegyületek hatása a zebradánió (*Danio rerio*) sperma minőségére. XX. Ifjúsági Tudományos Fórum nemzetközi konferencia, Keszthely, 2014. május 23-24, kivonat 38-47.p.

Kollár, T., Csenki, Z., Kovács, R., Bernáth, G., Horváth, Á.: Különböző fluoridvegyületek hatása a zebradánió (*Danio rerio*) sperma minőségére. VIII. Kárpát-medencei Biológiai Szimpózium - I. Fenntartható Fejlődés a Kárpát-medencében nemzetközi konferencia, Budapest, 2013. november 21-23., kivonat 44-45.p.

7. A szerzőnek az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó publikációi

Tudományos folyóiratban megjelent közlemények:

Kása, E., Lujić, J., Marinović, Z., **Kollár, T.**, Bernáth, G., Bokor, Z., Urbányi, B., Lefler, K., K., Jesenšek, D., Horváth, Á. (2018): Development of sperm vitrification protocols for two endangered salmonid species: the Adriatic grayling, *Thymallus thymallus* and the Marble trout, *Salmo marmoratus*. *Fish Physiology and Biochemistry*, nyomtatásban, doi: 10.1007/s10695-018-0516-y.

Cejko, B.I., Horváth, Á., **Kollár, T.**, Kása, E., Lujić, J., Marinović, Z., Urbányi, B., Kowalski, R.K. (2018): Optimisation of sodium and potassium concentrations and pH in the artificial seminal plasma of common carp *Cyprinus carpio* L. *Fish Physiology and Biochemistry*, nyomtatásban, doi: 10.1007/s10695-018-0491-3.

Herranz-Jusado, J.G., Kása, E., **Kollár, T.**, Gallego, V., Peñaranda, D.S., Rozenfeld, C., Pérez, L., Horváth, Á., Asturiano J.F. (2018): Handling and treatment of male European eels (*Anguilla anguilla*) for hormonal maturation and sperm cryopreservation. *The Journal of Visualized Experiments (JoVE)* 131: e56835, doi: 10.3791/56835.

Faragó, B., **Kollár, T.**, Szabó, K., Budai, C., Losonczi, E., Bernáth, G., Csenki-Bakos, Z., Urbányi, B., Pribenszky, Cs., Horváth, Á., Cserepes, J. (2017): Stimulus-triggered enhancement of chilling tolerance in zebrafish embryos. *PLoS ONE* 12(2): e0171520, doi: 10.1371/journal.pone.0171520 (megosztott első szerzős cikk)

Kollár, T., Cserepes, J., Szabó, K., Faragó, B., Budai, C., Pribenszky, C., Bernáth, G., Kása, E., Csenki, Zs., Horváth, Á. (2017): Halembriók alacsony hőmérsékletű tárolása. *Állattenyésztés és takarmányozás* 66(2): 168-173.

Kása, E., Bernáth, G., **Kollár, T.**, Lujić, J., Marinović, Z., Urbányi, B., Di Chiacchio, I., Horváth, Á. (2016): Vitrification of fish sperm: Investigation the supposed positive effect of trehalose. *Cryobiology* 73(3): 409.

Bernáth, G., Żarski, D., Kása, E., Staszny, A., Várkonyi, L., **Kollár, T.**, Hegyi, A., Bokor, Z., Urbányi, B., Horváth, A. (2016): Improvement of Common Carp (*Cyprinus Carpio*) Sperm Cryopreservation Using a Programmable Freezer. *General and Comparative Endocrinology* 237: 78-88.

Kása, E., Bernáth, G., **Kollár, T.**, Żarski, D., Lujić, J., Marinović, Z., Bokor, Z., Hegyi, A., Urbányi, B., Vílchez, M.C., Morini, M., Peñaranda, D.S., Igualada, L.P., Nemesio, J.F.A., Horváth, A. (2016): Development of sperm vitrification protocols for freshwater fish (Eurasian perch, *Perca fluviatilis*) and marine fish (European eel, *Anguilla anguilla*). *General and Comparative Endocrinology* 245: 102-107.

Bernáth, G., Zarski, D., Kása, E., Staszny, Á., Várkonyi, L., **Kollár, T.**, Hegyi, Á., Bokor, Z., Urbányi, B., Horváth, Á. (2016): A pontysperma mélyhűtés módszertani fejlesztése. *Halászat – Tudomány* 2(2): 18-26.

Bernáth, G., Bokor, Z., Kása, E., Várkonyi, L., Hegyi, Á., **Kollár, T.**, Urbányi, B., Żarski, D., Radóczy, Ifj J., Horváth, Á. (2015): Comparison of two different methods in the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. *Cryobiology* 70(1): 76-78.

Bernáth, G., Żarski, D., Krejszeff, S., Palińska-Żarska, K., Bokor, Z., Król, J., **Kollár, T.**, Kucharczyk, D., Urbányi, B., Horváth, Á. (2015): Optimization of conditions for the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis* Linnaeus, 1758) sperm. *Journal of Applied Ichthyology* 31: 94–98.

Bokor, Z., Bernáth, G., Kása, E., Várkonyi, L., Hegyi, Á., **Kollár, T.**, Urbányi, B., Zarski, D., Radóczy, J., Horváth, Á. (2015): Két spermamélyhűtési eljárás alkalmazhatóságának összehasonlítása csapósügér (*Perca fluviatilis*) fajban. Halászat 108(3): 25-29.

Konferencia kiadványban megjelent közlemények:

Kása, E., **Kollár, T.**, Lujic, J., Marinovic, Z., Bernáth, G., Urbányi, B., Horváth, Á.: Development of sperm vitrification methods for eight fish species. VIII International Conference "Water & Fish", Belgrád, Szerbia, 2018. június 13-15., kivonat 285-286.p.

Scekic, I., Marinovic, Z., Kása, E., **Kollár, T.**, Urbányi, B., Horváth, Á., Lujic, J.: Sperm subpopulation of common carp (*Cyprinus carpio*). VIII International Conference "Water & Fish", Belgrád, Szerbia, 2018. június 13-15., kivonat 319-321.p.

Kása, E., **Kollár T.**, Lujic, J., Marinovic, Z., Urbányi, B., Horváth, Á.: Vitrification of zebrafish (*Danio rerio*) germ cells for gene conservation purposes. Fiatal Biotechnológusok Országos Konferenciája, Budapest, 2018. március 28-29., kivonat 70.p.

Kása, E., Lujic, J., Marinovic, Z., **Kollár, T.**, Urbányi, B., Horváth, Á.: Current opportunities for gene preservation of zebrafish (*Danio rerio*). Aquaculture Europe 2017, Dubrovnik, Horvátország, 2017. október 17-20., kivonat 567-568.p.

Horváth, Á., **Kollár, T.**, Bernáth, G., Urbányi, B., Csenki-Bakos, Z., Faragó, B., Szabó, K., Budai, C., Losonczi, E., Cserepes, J.: PTAT preconditioning of zebrafish embryos in order to increase their chilling resistance. 6th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Vodnany, Csehország, 2017. szeptember 4-7., kivonat 79.p.

Marinovic, Z., Lujic, J., Kása, E., **Kollár, T.**, Csenki, Z., Urbányi, B., Horváth, Á.: Cryopreservation of spermatogonia of different zebrafish lines by whole testes needle immersed vitrification. 10th European Zebrafish Meeting, Budapest, 2017. július 3-7., kivonat 321.p.

Faragó, B., **Kollár, T.**, Szabó, K., Budai, C., Losonczy, E., Bernáth, G., Csenki, Z., Urbányi, B., Pribenszky, C., Horváth, Á., Cserepes, J.: A specific preconditioning technology enables zebrafish embryos to survive 24-hour long chilling on ice. 10th European Zebrafish Meeting, Budapest, 2017. július 3-7., kivonat 319.p.

Losonczy, E., Szabó, K., **Kollár, T.**, Csenki, Z., Gazsi, G., Horváth, Á., Urbányi, B., Gyüre, Z., Zsigmond, Á., Varga, M., Varga, Z., Pribenszky, C., Cserepes, J.: A protocol to arrest zebrafish embryonic development at different stages of ontogeny. 10th European Zebrafish Meeting, Budapest, 2017. július 3-7., kivonat 439.p.

Kása, E., Lujic, J., Marinovic, Z., **Kollár, T.**, Urbányi, B., Horváth, Á.: Zebradánió (*Danio rerio*) spermatogóniumok vitrifikációja génmegőrzési célból. Magyar Laborállat-tudományi Egyesület Nemzetközi Tudományos Ülése, Budapest, 2017. május 25.

Kása, E., Jesensek, D., Bernáth, G., **Kollár, T.**, Bokor, Z., Urbányi, B., Horváth, Á.: Vitrification of the sperm of salmonid species. 22nd International Congress of Zoology, Okinawa, Japán, 2016. november 14-19., kivonat 73.p.

Kollár, T., Cserepes, J., Szabó, K., Faragó, B., Budai, Cs., Pribenszky, C., Bernáth, G., Csenki, Z., Horváth, Á.: Halembrriók alacsony hőmérsékletű tárolása. 22. Szaporodásbiológiai Találkozó, Kecskemét, 2016. november 11-12., kivonat 20.p.

Kása, E., Lujic, J., Marinovic, Z., **Kollár, T.**, Urbányi, B., Horváth, Á.: A génmegőrzés lehetőségei zebraadánió (*Danio rerio*) fajban: sperma- és ósivarsejt vitrifikáció. 22. Szaporodásbiológiai Találkozó, Kecskemét, 2016. november 11-12., kivonat 27.p.

Kása, E., Bernáth, G., **Kollár, T.**, Lujic, J., Marinovic, Z., Urbányi, B., Di Chiacchio, I., Horváth, Á. Vitriification of fish sperm: Investigation the supposed positive effect of trehalose. CRYO2016: 53rd Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Ottawa, Kanada, 2016. július 23-27., kivonat 26-27.p.

Kollár, T., Cserepes, J., Szabó, K., Faragó, B., Budai, C., Bernáth, G., Horváth, Á.: Halembrók tárolása 0 °C-on. VI. Gödöllői Halászati-Horgászati Szakember Találkozó, 2016. február 4-5.

Bokor, Z., Horváth, Á., Zarski, D., Krejszeff, S., Kása, E., **Kollár, T.**, Várkonyi, L., Hegyi, Á., Staszny, Á., Radóczy, J. Ifj., Urbányi, B., Bernáth, G.: Systematic development of cryopreservation technology in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. Aquaculture Europe 2015, Rotterdam, Hollandia, 2015. október 20-23., kivonat 110-111.p.

Kollár, T., Horváth, Á., Labesse, C., Milon, P., Csenki, Z., Kovács, R., Bernáth, G., Béres, T., Depincé, A., Urbányi, B., Labbé, C.: Deleopment of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Ancona, Olaszország, 2015. szeptember 7-11., kivonat 161.p.

Bernáth, G., Kása, E., Szentes, K., Staszny, Á., Várkonyi, L., **Kollár, T.**, Hegyi, Á., Bokor, Z., Urbányi, B., Horváth, Á.: Improvement of common carp (*Cyprinus carpio*) sperm cryopreservation: The applicability of a controlled rate freezer as a standard device. 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Ancona, Olaszország, 2015. szeptember 7-11., kivonat 98.p.

Kása, E., Bernáth, G., **Kollár, T.**, Żarski, D., Lujic, J., Marinović, Z., Bokor, Z., Hegyi, Á., Urbányi, B., Vílchez, M.C., Morini, M., Peñaranda, D.S., Pérez, L., Asturiano, J.F., Horváth, Á.: Vitrification of fish sperm. 5th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Ancona, Olaszország, 2015. szeptember 7-11., kivonat 106.p.

Kása, E., Bernáth, G., **Kollár, T.**, Zarski, D., Lujic, J., Marinovic, Z., Bokor, Z., Hegyi, Á., Urbányi, B., Horváth, Á.: Vitrification of the sperm of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*). 7th International Conference „Water & Fish”, Belgrád, Szerbia, 2015. június 10-12., kivonat 303.p.

Bernáth, G., Bokor, Z., Zarski, D., Kása, E., **Kollár, T.**, Várkonyi, L., Hegyi, Á., Urbányi, B., Horváth, Á.: Out of season quality assessment and cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. 7th International Conference „Water & Fish”, Belgrád, Szerbia, 2015. június 10-12., kivonat 178.p.

Lujic, J., Marinovic, Z., Bernáth, G., **Kollár, T.**, Kása, E., Radojkovic, N., Simic, V., Cirkovic, M., Urbányi, B., Horváth, Á.: Success of cryopreserved tench (*Tinca tinca* L., 1758) sperm in fertilization and hatching. XX Savetovanje o Biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Cacak, Szerbia, 2015. március 13-14., kivonat 417-421.p.

Kollár, T., Bernáth, G., Csenki, Z., Kovács, R., Kása, E., Urbányi, B., Horváth, Á.: Development of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) sperm. Aquaculture Europe 2014, Donostia-San Sebastián, Spanyolország, 2014. október 14-17., kivonat 654-655.p.

Bernáth, G., Bokor, Z., Kása, E., Várkonyi, L., **Kollár, T.**, Hegyi, Á., Urbányi, B., Horváth, Á.: The comparison of two different method in cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. Aquaculture Europe 2014, Donostia-San Sebastián, Spanyolország, 2014. október 14-17., kivonat 133-134.p.

Lujic, J., Bernáth, G., Marinovic, Z., **Kollár, T.**, Kása, E., Simic, V., Cirkovic, M., Urbányi, B., Horváth, Á.: The effect of extenders and cryoprotectants on various parameters of cryopreserved tench (*Tinca tinca*) sperm. Aquaculture Europe 2014, Donostia-San Sebastián, Spanyolország, 2014. október 14-17., kivonat 756-757.p.

Kollár, T., Bernáth, G., Csenki, Z., Kovács, R., Kása, E., Horváth, Á.: Zebradánió (*Danio rerio*) spermamélyhűtésének kidolgozása. XXXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 2014. május 28-29., kivonat 37.p.

Lujic, J., Bernáth, G., Marinovic, Z., **Kollár, T.**, Kása, E., Simic, V., Cirkovic, M., Urbányi, B., Horváth, Á.: Post-thawing storage test in tench (*Tinca tinca* L.): Significance for aquaculture. XIX Savetovanje o Biotehnologiji sa međunarodnim učešćem, Cacak, Szerbia, 2014. március 7-8., kivonat 415-420.p.

Bernáth, G., Żarski, D., Krejszeff, S., Palińska-Żarska, K., **Kollár, T.**, Bokor, Z., Kucharczyk, D., Urbányi, B., Horváth, Á.: Systematic optimization of conditions for the cryopreservation of Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) sperm. 4th International Workshop on the Biology of Fish Gametes, Albufeira, Portugália, 2013. szeptember 17-20., kivonat 128-129.p.