

XXXII. OTDK Biológia Szekció

Különböző fluoridvegyületek hatása
a zebradánio (*Danio rerio*) sperma minőségére

Készítette: Kollár Tímea

Évfolyam: Ökotoxikológus MSc II.

Szent István Egyetem

Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar

Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet

Halgazdálkodási Tanszék

Belső konzulensek: Dr. Horváth Ákos

Tudományos főmunkatárs

Kovács Róbert

Tanszéki mérnök

Bernáth Gergely

PhD-hallgató

Gödöllő

2013

I. BEVEZETÉS

A halsperma minőségének számos paramétere számszerűsíthető, ezáltal toxikológiai tesztek végpontjaként szolgálhat. Mind közül a legfontosabb paraméter a spermiumok motilitása, mivel szoros korrelációban áll a termékenyítő képességgel. A hímivarsejtek mozgásának intenzitására és időtartamára a különböző szennyezőanyagok közvetlenül, vagy a halak kitettségén keresztül közvetve, hatással lehetnek.

A számítógépes spermavizsgálat (Computer Assisted Sperm Analysis) gyors és objektív mód a spermaminőség egyes paramétereinek megállapítására, melynek segítségével a különböző toxikus anyagok spermára gyakorolt hatása kvantitatív módon becsülhető. Számos tényező létezik, amelyre a sperma vizsgálatát optimalizálni kell (immobilizálás, aktiválás, hígítás aránya stb.), viszont a különböző fajoktól származó sperma eltérő tulajdonságainak köszönhetően, minden egyes halfaj esetében más-más feltételeket kell biztosítani a hímivarsejtek motilitásának biztosítása érdekében. Ebből kifolyólag a számítógépes spermavizsgálat jelenleg halak esetében nem standardizált egy faj esetében sem, és a kapott eredmények összehasonlítása nem, vagy csak kellő körültekintéssel lehetséges.

A zebradánió (*Danio rerio*) napjainkban széles körben elterjedt gerinces modellállat a toxikológiai kísérletekben előnyös tulajdonságai miatt (könnyű kezelhetőség, rövid generációs idő, jól kifejezett ivari dimorfizmus, kiváló reprodukciós képesség stb.), spermatoxikológiai vizsgálatáról azonban minimális szakirodalmi adat áll rendelkezésünkre.

A nátrium-fluorid megtalálható a természetben: kőzetek, ásványok és a természetes vizek tartalmazzák ezt a vegyületet. Ipari melléktermékként nagy mennyiségben kerül ki a környezetbe, ami alumínium-, üveggyártás és műtrágyakészítés során keletkezik, valamint peszticidek, antibiotikumok és szájápolási termékek is tartalmazzák ezt a vegyületet. Toxicitása széles körben tesztelt, spermiumokra kifejtett hatását viszont csak emlősök esetében vizsgálták. Az 5-fluorouracil egy pirimidin-analóg, antimetabolikus tulajdonsága miatt széleskörűen alkalmazzák kemoterápiás szerek hatóanyagaként. Kiválasztás útján a vizelettel kijut a szennyvízbe, így a természetes vizekben is megjelenhet. Toxikus hatásáról jelenleg kevés adattal rendelkezünk. E két fluoridtartalmú vegyület spermiumokra kifejtett hatását halak – és így zebradánió – esetében még nem vizsgálták.

I. 1. Célkitűzések

A dolgozatban bemutatott munkánk során legfőbb célunk egy olyan módszer kidolgozása volt, melynek segítségével a zebradánio sperma toxikológiai célú vizsgálata standardizálható, ezáltal a kapott eredmények összehasonlíthatók, ami kulcsfontosságú a különböző szennyezőanyagok termékenységet befolyásoló hatásának megítélésében. Vizsgálataink során teszteltük a különböző spermanyerési módokat, az immobilizáló és aktiváló oldatokat, az alkalmazható hígítási arányokat, valamint a motilitás mérésének lehetséges időpontjait.

További céljaink közt szerepelt, hogy két fluoridtartalmú vegyület, a nátrium-fluorid és az 5-fluorouracil zebradánio sperma minőségére, ezen belül a spermiumok progresszív motilitására kifejtett hatását megvizsgáljuk, a halak kitettségén keresztül közvetve (*in vivo*), illetve a spermiumok kitettségén keresztül közvetlenül (*in vitro*). Az 5-fluorouracil *in vivo* spermatoxikológiai vizsgálata az Európai Unió 7. kutatási keretprogramja által támogatott CytoThreat pályázat részét képezte, mely a különböző citosztatikumok környezetre gyakorolt hatásával foglalkozik.

II. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

II. 1. A halspermiumok aktivációjának folyamata

A halspermiumok – szemben a hüllő és emlős spermiumokkal - a herében és a szeminális plazmában immotilisak: az ozmolaritás és a szeminális plazma összetétele gátolja meg a mozgást. Természetes körülmények között, az ívás folyamán, vízzel vagy a nőtény genitális traktusával találkozva aktiválódnak a hímivarsejtek.

Pisztráng- és tokféléknél a K^+ -koncentráció a kulcsfontosságú tényezője a spermiumok motilissá válásának. A szeminális plazma és a spermiumok megközelítőleg azonos koncentrációban tartalmaznak K^+ -t. Az ivartermék vízzel való felhígulásának következtében K^+ -kiáramlás (*efflux*) következik be a spermiumsejtből a membráncsatornákon keresztül, ami membrán-hiperpolarizációhoz vezet, ez indítja be a spermiumok motilitását. Pontyfélék esetében, mivel a szeminális plazma K^+ -koncentrációja jelentősen magasabb, mint a spermiumoké, ezért az ivartermék felhígulása nem vezet membrán-hiperpolarizációhoz, tehát a K^+ -koncentráció megváltozása önmagában nem elegendő a spermiumok motilissá válásához. Ebben az esetben az ozmózis a kulcsfontosságú: az ivartermékben jelenlévő magas ozmotikus nyomás miatt, a spermiumok hipotonikus közegbe kerülve aktiválódnak (ALAVI & COSSON 2006).

Minden halfajról elmondható viszont, hogy a flagellum mozgásának intenzitása szoros korrelációban áll a spermiumsejt ATP koncentrációjával. Mivel a halak spermiumában kevés mitokondrium található, mely az energiát szolgáltatná, ezért a hímivarsejtek motilitása az aktivációt követően nagyon gyorsan csökken, és pár percen belül teljesen meg is szűnik (COSSON ET AL. 2013).

II. 2. A halsperma minősége

A sperma minősége számszerűsíthető: olyan paraméterekkel leírható, melyek az ikrát megtermékenyítő képességét kifejezik. Ezek a paraméterek, illetve biomarkerek többek között a spermatokrit, a sperma sűrűsége, a szeminális plazma ozmolaritása, pH-ja és kémiai összetétele, enzimatis aktivitás, adenosin-trifoszfát (ATP) koncentráció, spermiumok motilitása, morfológiája és a termékenyítőképesség. A sperma minőségének pontos megállapítása számos célt szolgál, többek között a mesterséges szaporítás eredményességének

előrejelzését, vagy a környezetben előforduló szennyezőanyagok hatásának becslését a halak reprodukciós sikerére (RURANGWA ET AL. 2004).

A halspermiumok mozgásának jellemzői – úgymint a mozgás beindulása, időtartama – eltérőek lehetnek a különböző halfajok esetében, mely az élettani sajátosságokra vezethető vissza (ld. II. 1. fejezet). A mozgás időtartama kritikus tényező a sikeres megtermékenyítésben, ugyanis a spermiumnak a rendelkezésre álló idő alatt kell megtalálnia az ikra felszínén azt az egyedüli pontot, a mikropylét, amelyen keresztül képes az ikra belsejébe hatolni, és megtermékenyíteni azt. Ez különösen nagy ikraszemekkel rendelkező halfajok esetében kulcsfontosságú (pl. pisztrángfélék). Egyértelmű tehát, hogy a magas motilitással rendelkező hímivarsejtek nagyobb eséllyel képesek a megtermékenyítésre, így ez a paraméter kulcsfontosságú a sperma vizsgálata során (RURANGWA ET AL. 2004).

A sperma minőségének megváltozása befolyásolhatja a termékenyítő képességet, ezáltal predesztinálható a szaporodás, illetve szaporítás sikeressége. Éppen ezért kulcsfontosságú, hogy ezeket a tényezőket – a lehetőségekhez mérten – optimalizáljuk. Az 1. táblázat szemlélteti azokat a paramétereket, amelyek a sperma minőségére hatással vannak. Ezek közül az ivartermék kinyerés utáni kezelése kiemelendő.

1. táblázat: A sperma minőségét befolyásoló tényezők (HAJIREZAE ET AL. 2010)

Biológiai tulajdonságok	Tartási és tenyésztési körülmények	Sperma kinyerés utáni kezelése
• Kor • Testtömeg • Testhossz	• Fotoperiódus • Hőmérséklet • Táplálék • Nemkívánatos komponensek jelenléte a vízben illetve a táplálékban • Állatjólét • Egészség	• Aktiváló oldat • Immobilizáló oldat • Kontamináció • Rövid, illetve hosszú távú tárolás

II. 2. 1. A sperma kinyerés utáni kezelése

A halsperma természetéből kifolyólag (ld. II. 1. fejezet) kétlépcsős hígításra van szükség az ivartermék kinyerése után: az első hígítást egy olyan oldattal kell elvégezni, melynek ozmolaritása megegyezik az adott faj szemínális folyadékával, és amelyben az ivartermék pár órán keresztül tárolható anélkül, hogy a hímivarsejtek motilissá válnának. Ezt

követi a második hígítás, közvetlenül a felhasználás előtt, ami beindítja a sejtek mozgását (BILLARD & COSSON 1992). Ezt víz, vagy aktiváló oldat alkalmazásával lehet elérni.

Az immobilizáló és aktiváló oldat kémiai összetétele befolyásolja a sejtek motilitását. Pisztráng- és pontyfélék esetében is a fejés után alkalmazott magas K^+ -tartalmú oldatok meggátolják a hímivarsejtek mozgásának aktivációját. Pontyfélék esetében az egyik leggyakrabban alkalmazott immobilizáló oldat összetétele: 200 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8, (SAAD & BILLARD 1987). Ebből kifolyólag az aktiválás során használt alacsony K^+ -koncentrációjú oldatok beindítják a motilitást (SCHEURING 1925, KUSA 1950, MORISAWA ET AL. 1983, BILLARD ET AL. 1987, TANIMOTO ET AL. 1994). Pontyfélék esetében – mivel az ozmotikus viszonyok is befolyásolják a sejtek mozgását - az aktiválás során hipotóniás oldatok alkalmazása szükséges. A hipoozmotikus sokk hatására a sejtmembrán hiperpolarizációja következik be, ami aktiválja a Ca-csatornákat. Krasznai és mtsai szerint (1995, 2000) ezért pontyfélék esetében olyan aktiváló oldat alkalmazása szükséges, mely Ca^{2+} -t tartalmaz. Saad és Billard (1987) viszont leírt egy olyan, pontyfélék esetében széleskörűen alkalmazott aktiváló oldatot, mely nem tartalmaz Ca^{2+} -t. Ennek összetétele: 45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8.

Az aktiváló oldat összetételén kívül, annak hőmérséklete és pH-ja is fontos tényező. Pisztráng- és pontyféléknél a hőmérséklet befolyásolja a spermiumok mozgásának intenzitását (COSSON ET AL. 1985). Pisztráng esetében a magasabb hőmérséklet növeli a motilitás intenzitását, viszont időtartamát csökkenti (BILLARD AND COSSON 1992), míg az alacsonyabb hőmérséklet, melyben a pisztráng természetes körülmények közt ívik (4 és 10°C között), növeli a spermiumok mozgásának időtartamát (VAN LOOK 2001). A természetes körülmények között melegvízben élő afrikai harcsa (*Clarias gariepinus*) esetében is igaz viszont, hogy az alacsony hőmérséklet (4°C) elnyújtja a mozgás időtartamát és a sejtek életképességét, szemben a számára természetes 25°C-kal (MANSOUR ET AL. 2002). A pH tekintetében, pisztráng- és pontyféléknél a szeminális folyadékkal megegyező, vagy annál magasabb pH növeli a mozgó sejtek százalékos arányát és a spermiumok termékenyítő képességét (BILLARD ET AL. 1974, BILLARD 1981).

Számos faj esetében, a sperma vizelettel történő szennyeződése a fejés során, a spermiumok spontán aktivációját okozza, melyből kifolyólag immotilissá válnak, még mielőtt a spermium kapcsolatba léphetne az ikrával a termékenyítés során. Lazac (*Salmo salar*) esetében a vizelettel történő szennyeződés ugyanúgy megváltoztatja az ozmotikus nyomást a szeminális plazmában, mint a K^+ -koncentráció (RANA 1995). Ponty (*Cyprinus carpio*) sperma vizelettel történő kontaminációja a spermiumok energiakészletének és motilitásának

csökkenését okozza (PERCHEC ET AL. 1995A, 1998). Éppen ezért szükséges a sperma minőségét felhasználás előtt megállapítani, mivel annak vizelettel történő szennyeződése sokszor elkerülhetetlen (HAJIREZAE ET AL. 2010).

A sperma minősége megváltozhat a tárolás alatt. Rövid távú tárolásra az alacsony, 4°C körüli hőmérséklet alkalmas. Mindazonáltal az anaerob körülmények és a mikrobiális szennyezés csökkentheti a spermiumok motilitását és életképességét (HAJIREZAE ET AL. 2010). Csatornaharcsánál (*Ictalurus punctatus*) megfigyelték, hogy 10 napos, 4°C-on történő tárolás hatására csökkent a sperma minősége a bakteriális fertőzés, az extracelluláris enzimtermelés és az oxigénfogyasztás hatására (JENKINS & TIERSCH 1997). Nem steril oldatban való tartás esetén, 3 nap alatt a motilitás teljes megszűnésével kell számolni (HAJIREZAE ET AL. 2010).

Hosszú távú tárolásra a folyékony nitrogén alkalmas, amelyet halsperma esetében rutinszerűen alkalmaznak. Ebben az esetben a meghatározó faktorok a hűtési és felolvasztási ráta, valamint a védőanyag és hígító kémiai összetétele (MCANDREW ET AL. 1993).

II. 3. Spermavizsgálat

A spermiumok mozgásának fontos összetevői a motilis sejtek aránya, a motilitás időtartama és sebessége, amelyet korábban szubjektív módon vizsgáltak (FAUVEL ET AL. 2010). Pontos megállapításuk azonban elengedhetetlen, mivel pozitív korrelációban állnak a termékenyülés sikerével. A számítógépes spermavizsgálat (Computer Assisted Sperm Analysis) a leggyorsabb és legobjektívebb módja ezen paraméterek megállapításának (WILSON-LEEDY & INGERMANN 2007). A módszer lényege, hogy a spermavizsgálathoz használt mikroszkóphoz egy kamerát csatlakoztatnak, ami felvételeket készít a tárgyasztalon elhelyezett kamrába juttatott ivarterméről. A spermavizsgálathoz használt kamrák közül az egyik legelterjedtebb a Makler-kamra: 10 µm rétegvastagságot biztosít, ezáltal meggátolja, hogy a sejtek függőleges irányban elmozduljanak, így csak egy rétegben jelennek meg a mikroszkóp látóterében (LU ET AL. 2011). Az ivarterméről 10-20× negatív fáziskontraszt objektívvel készíthetők felvételek, melyet egy számítógépes program elemez (1. ábra). A szoftver felismeri a sejteket, és megállapítja a progresszíven mozgó sejtek százalékos arányát.



1. ábra: A Halgazdálkodási Tanszéken található számítógépes spermavizsgáló rendszer
(Fénykép: Horváth Ákos, 2011)

A motilitás mérése során adódhatnak problémák, melyeket ki kell küszöbölni. Egyrészt ha túl korán aktiváljuk a spermiumokat, akkor a mérés megkezdéséig jelentősen csökkenhet motilitásuk, melynek következtében félrevezető eredményeket kaphatunk a mérés elvégeztével. Éppen ezért kulcsfontosságú, hogy a sperma aktiválását közvetlenül a mérés előtt, a mikroszkóp tárgylemezén végezzük el. Másik probléma, hogy a spermiumok letapadhatnak a tárgylemezre. Ezt megelőzendő, a mérés megkezdése előtt 1% szarvasmarha szérum albumint ajánlatos hozzákeverni az aktiváló oldathoz (BILLARD ET AL. 1995). Ugyanezt a hatást érhetjük el 1% polivinil-alkohol alkalmazásával (PERCHEC ET AL. 1995B). Továbbá előfordulhat, hogy a spermiumsejtek a mikroszkóp tárgylemezén, a folyadékban sodródhatnak – ún. drift alakul ki. A mérés során a program a hímivarsejtek sodródását tényleges motilitásként érzékelheti, ami torzító tényező lehet. Ezt elkerülendő, tanácsos a motilitás mérését akkor megkezdeni, amikor már a drift teljesen megszűnt (KIME ET AL. 1996).

A CASA rendszer a spermiumok mozgásának vizsgálatával alkalmas olyan változások kimutatására, melyek a hímivarsejtek csökkent motilitásában mutatkoznak meg. Alkalmas a spermatárolás és -mélyhűtés hatékonyságának fejlesztésére, az anyahalak szelektálására, a termékenyítés körülményeinek optimalizálására, valamint különböző szennyezőanyagok hatásának monitorozására.

II. 3. 1. Toxikológiai célú spermavizsgálat

A halak fontos kísérleti modellrendszerek az ökotoxikológiai vizsgálatokban, mivel ezek a fajok vannak leginkább kitéve a környezeti szennyezéseknek (KIME ET AL. 1999). Az alacsony koncentrációjú, hosszú távú szubletális szennyezések okozhatják a termékenység csökkenését, mely megnyilvánulhat indirekt módon, a reprodukciós szervekben történő akkumuláció útján, vagy direkt módon, a vízben szabaddá váló gamétákkal közvetlenül találkozva. Mivel a spermaminőség a sikeres szaporodás egyik fő tényezője, ezért a motilitás a vízi szennyezések érzékeny és pontos bioindikátora lehet (KIME ET AL. 1996). Számos publikáció létezik a szennyezőanyagok spermatoxikológiai vizsgálatával kapcsolatban, ennek ellenére halak esetében a számítógépes spermavizsgálat nem standardizált, ezért az eredmények összehasonlítása nem, vagy csak kellő körültekintéssel lehetséges (KIME ET AL. 2001).

Kime és mtsai (1996) kétféle módon vizsgálták a spermára kifejtett toxikus hatást afrikai harcsa esetében: az egyik eljárás szerint a spermamintákat olyan immobilizáló oldatokban tárolták 24 órán keresztül, mely különböző koncentrációkban tartalmazták a vizsgálandó anyagokat, az intratesztikuláris expozíció analógiájára. A másik vizsgálat során az aktiváló oldat tartalmazta nagyobb koncentrációban a vizsgálati anyagokat, a hímivarsejtek közvetlen vízi szennyezésének analógiájára. A sperma aktiválás során bekövetkező szennyeződése kevésbé volt toxikus a spermiumokra nézve, mint immobilizált állapotban, alacsonyabb koncentrációban a 24 órás expozíció.

II. 4. A zebradánio (*Danio rerio*)

II. 4. 1. Általános jellemzők

A zebradánio a pontyfélék (*Cyprinidae*) családjához tartozó, a trópusokról származó, igen kedvelt édesvízi akvárium díszhal (2. ábra). Oldala és hasa sárgásfehér, háta olajbarna színezetű. Néhány kékes színű vízszintes vonal fut végig a test teljes hosszában, a farokúszó legvégéig (HORN & ZSILINSZKY 1993). A csíkozottság a farok alatti úszón is megfigyelhető, viszont a hasúszón nem. Testhosszuk 4-5 cm. A zebradánio mindenevő, csoportban élő halfaj (MILLS 1998).



2. ábra: Zebradánió (Fénykép: Halgazdálkodási Tanszék, 2011)

II. 4. 2. A zebradánió mint kísérleti állat

Az állatjólét elvárásainak megfelelő 3R-stratégia egyre inkább elterjedőben van, melynek fő célja az emlősökön végzett tesztek kiváltása más, alacsonyabb rendű szervezetekkel (Replacement), a kísérletbe vont állatok létszámának csökkentése (Reduction), valamint a finomítás abban, hogy a kísérletek a lehető legkevesebb fájdalommal és szenvedéssel járjanak (Refinement). Emellett a halak az egyetlen gerinces szervezetek, melyek teljes életciklusukat a vízben töltik. Mindezek hozzájárultak ahhoz, hogy az elmúlt években egyre inkább elterjedőben van a zebradánió mint gerinces modellállat a laboratóriumi kísérletekben. E fajon végzett vizsgálatok főbb területei a fejlődésbiológia, toxikológia, ökotoxikológia, élettan, gyógyszer-hatásvizsgálatok és biotechnológia. Olyan törvényszerűségek vizsgálhatók a zebradánión, amik a gerincesek törzsének más fajaira is érvényesek. Egyre több laboratórium és recirkulációs rendszer épül a világon, amely a zebradánió tartására rendezkedik be (YANG & TIERSCH 2008).

Számos előnnyel rendelkezik a modellállatként való alkalmazás tekintetében, melyek a következők:

- laboratóriumi emlősökhöz képest e faj ellátási és fenntartási költségei alacsonyabbak,
- békés természet,
- kevésbé érzékeny a víz, illetve a táplálék minőségére,
- az állatonkénti helyigény minimális: akár 20-30 egyed is tartható egy 3 literes akváriumban,
- beltenyésztésre kevésbé érzékeny,
- generációs ideje rövid: a keléstől számított 2-3 hónapon belül kifejllett, ivarérett az egyed, ezáltal könnyen, nagy mennyiségben tenyészthető,

- reprodukciós képessége kiváló: egy nőténytől, egy hét alatt több száz ikraszem nyerhető, egy hímétől pedig több μ l-nyi sperma,
- trópusi-szubtrópusi halfaj lévén egész év során szaporodóképes, ezáltal folyamatosan tenyészthető, illetve alkalmas reprodukciós vizsgálatokra,
- embriófejlődése testen kívüli (*ex utero*): az embrió és az ikrahéj átlátszó, ezáltal jól nyomon követhetők az egyes fejlődési állapotokban bekövetkező változások,
- ivari dimorfizmusa jól kifejezett: a hímek karcsúak, vékonyak, testük aranyszínű, csíkjai sötétebbek, a nőtények gömbölyűek, hasuk ikrával telt, testük ezüstös színezetű, csíkjai kevésbé élénk színűek,
- jól kidolgozott vizsgálati módszerek állnak rendelkezésre e faj tekintetében,
- gyorsan fejlődik: a termékenyítéstől számított 48-72 órán belül megtörténik az embrió kelése az ikrából (HORN & ZSILINSZKY 1993, LELE & KRONE 1996).

A Gazdasági Együttműködési és Fejlesztési Szervezet (Organization for Economic Co-operation and Development) számos útmutatót adott ki, melyek a különböző kémiai anyagok toxikológiai vizsgálatával foglalkoznak nemzetközi szinten. A kísérletek elvégzéséhez az egyik javasolt faj a zebradanió. Ezen vizsgálatok végpontjai többek között a mortalitás, növekedés, viselkedés, megjelenésbeli változás. Halak esetében viszont csupán néhány szaporodásra vonatkozó irányelv létezik, melyek végpontjai az ivarszervek hisztopatológiai elváltozásai, valamint az endokrin aktivitás; az ivartermék vizsgálatát egyetlen útmutató sem említi.

II. 4. 3. A zebradanió-sperma jellemzői

Wilson-Leedy és mtsai (2009) különböző aktiváló oldatok zebradanió-sperma motilitására kifejtett hatását vizsgálták. A legnagyobb motilitást 40 mM NaCl oldattal tudták elérni, csapvízzel ennél némileg alacsonyabb motilitást tapasztaltak. NaCl esetében kezdetben alacsonyabb volt a motilitás, majd elkezdett növekedni, 30 másodpercnél érte el a maximumát, majd csökkenni kezdett. A csapvizet aktiváció során nem volt kezdeti növekvő szakasz a motilitásban, ebben az esetben az aktiváció után közvetlenül mérték a legmagasabb motilitást, ami az idő elteltével fokozatosan csökkent. A Na^+ kicserélése K^+ -ra nem okozta a motilitás megváltozását, melyből következik, hogy az aktiváló oldatnak nem az ionösszetétele, sokkal inkább az ozmolaritása a meghatározó a zebradanió sperma esetében.

Jing és mtsai (2009) optimalizálták a zebradanió sperma gyűjtését, aktiválását, hígítását és tárolását. A sperma immobilizálásához 300 mOsm/kg ozmolaritású Hanks-féle

sóoldatot alkalmaztak, melynek összetétele: 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 $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 1000 ml desztillált vízben, pH 7,5. Az aktiválás vonatkozásában megállapították, hogy a hipotóniás oldatok széles ozmolaritási tartományban (25-270 mOsm/kg) képesek a sperma aktiválására, de a legnagyobb motilitást 150 és 210 mOsm/kg közötti ozmolaritású oldatokkal érték el. Ezek közül is a legjobban a 170 mOsm/kg ozmolaritású Hanks-féle sóoldat aktivált, viszont desztillált vízzel aktiválva a spermiumok motilitása sokkal lassabban csökkent az idő elteltével.

A spermagyűjtés tekintetében elmondható, hogy a hímek fejésével magasabb motilitást lehet elérni ($90 \pm 4\%$), de ez a módszer időigényes, kevésbé hatékony, és minimális mennyiségű, 0,8-2 μl -nyi sperma nyerhető egy egyedtől, ezáltal egy vizsgálat elvégzéséhez nagyon sok minta szükségeltetik. E módszer alkalmazása esetén több egyedtől származó ivartermék összekeveréséhez, ún. poolozáshoz van szükség ahhoz, hogy egy vizsgálatához elegendő mennyiségű spermához juthassunk. A here sebészi úton történő eltávolítása egyszerű és gyors módszer, továbbá nagy mennyiségű sperma nyerhető általa, bár nem érhető el vele akkora motilitás ($65 \pm 13\%$), mint fejést alkalmazva.

A zebradánió sperma hígításánál ugyanúgy alkalmazandó a kétlépcsős hígítás (ld. II. 2. 2. 5. fejezet), mint a többi halfaj esetében. A 10 órás tárolás alatti 1:10 és 1:20 hígítási arányok nagyobb motilitást eredményeztek, mint az 1:50 és 1:100 arányú hígítás, mivel nagyobb hígítási arány alkalmazásával a spermiumok motilitása gyorsabban csökkent a tárolás alatt, mint alacsonyabb fokú hígítás esetén. A tárolást vizsgálva arra a megállapításra jutottak, hogy 4°C -on tartva a spermát hosszabb ideig megőrizhető mozgási képessége, mint szobahőmérsékleten (25°C) tárolva.

II. 4. 4. Zebradánió sperma toxikológiai célú vizsgálata

A zebradánió spermáját (mint a halakét általában) viszonylag kevés esetben használták toxikológia vizsgálatokra. McAllister és Kime (2003) a tributilin mint aromatóz inhibitor zebradánió spermára kifejtett káros hatásait vizsgálták embriókori kitettség esetén. Az egyedek ivartermékét fejés útján nyerték, melyből 1 μl -t 97 μl hígító oldatban (5,8 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 0,22 g/l CaCl_2 , 0,04 g/l $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$, 2,1 g/l NaHCO_3 , 0,04 g/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 3,75 g/l glicin desztillált vízben, pH 8,64) hígítottak, melyhez 2 μl 0,5%-os Rose Bengal-festéket keverték azért, hogy a spermiumsejtek láthatóbbá váljanak az analízis során.

A spermiumok motilitásának vizsgálatát CASA rendszerrel végezték el, az aktivációt követő 5 másodperc múlva készítettek felvételeket. Arról ugyancsak nem közöltek információt, hogy az aktiválást milyen oldattal, és milyen hígítási arányban végezték el. A tributilin 1 ng/l koncentrációban szignifikáns motilitáscsökkenést, 100 ng/l esetében pedig a motilitás teljes megszűnését okozta.

Thresher és mtsai (2011) szintén a tributilin zebradánió spermára gyakorolt hatását vizsgálták, az egész életciklust érintő kitettség esetén. A vizsgálandó anyagot a tápba keverve, 800 µg/g mennyiségben kapták. Az egyedektől fejéssel nyerték az ivarterméket, melyet egy lépcsőben hígítottak: a mintát a tárgylemezre juttatták, ahol vízzel aktiválták. A motilitást az aktiválást követő 30 másodpercen belül állapították meg. Arról azonban nem közöltek adatot, hogy mennyi ivarterméket használtak, és azt milyen arányban hígították. A tributilin nem okozott szignifikáns motilitáscsökkenést a kontroll csoporthoz képest.

II. 5. Nátrium-fluorid

A fluor egyike a legelektronegatívabb elemeknek, ezért elemi formában szinte egyáltalán nem található meg a természetben. Ionos alakja, a fluorid – nagy reaktivitása miatt - nagyon hamar kölcsönhatásba lép más elemekkel, ezáltal szervetlen, vagy - ritkább esetben - szerves fluoridvegyületeket alkot (GREENWOOD & EARNSHAW 1984).

A fluorid a földkéreg egyik alkotóeleme, ezen kívül ásványok is tartalmazhatják – fluorit, kriolit, foszforit vagy apatit formájában -, ezáltal beoldódva megtalálható a felszíni vizekben is 0,03 és 0,1 ppm közötti mennyiségben. Vulkanikus területeken ennek a mennyiségnek akár a többszöröse is előfordulhat (CAMARGO 2003). A fluorid fontos szerepet játszik a szervezet fejlődésében és egészségében. Az Egészségügyi Világszervezet (WHO) szerint (1987) az optimális napi fluoridbevitel 0,05-0,07 mg testtömegkg-onként, az ivóvízben pedig legkedvezőbb koncentrációja 1 ppm. Számos országban fluoriddal dúsítják az ivóvizet, a fogszuvasodást megelőzendő (RAO 2003).

Fontosabb fluoridvegyületek továbbá a freonok (diklór-difluor-metán), teflon (politetrafluoretilén), foly sav (hidrogén-fluorid), valamint a nátrium-fluorid. Az utóbbi évtizedekben ezen fluoridvegyületek - ezáltal a nátrium-fluorid - környezetbe juttatott mennyisége jelentősen megnövekedett antropogén tevékenységek hatására. A természetben előforduló fluorid egyik fő forrása az alumíniumkohászat. A foszfáttartalmú műtrágyák a természetben előforduló fluorid mennyiségét közel százszorosára növelték. Téglá-, kerámia- és üvegyártás során is jelentős mennyiségben kerül a környezetbe (CAMARGO 2003).

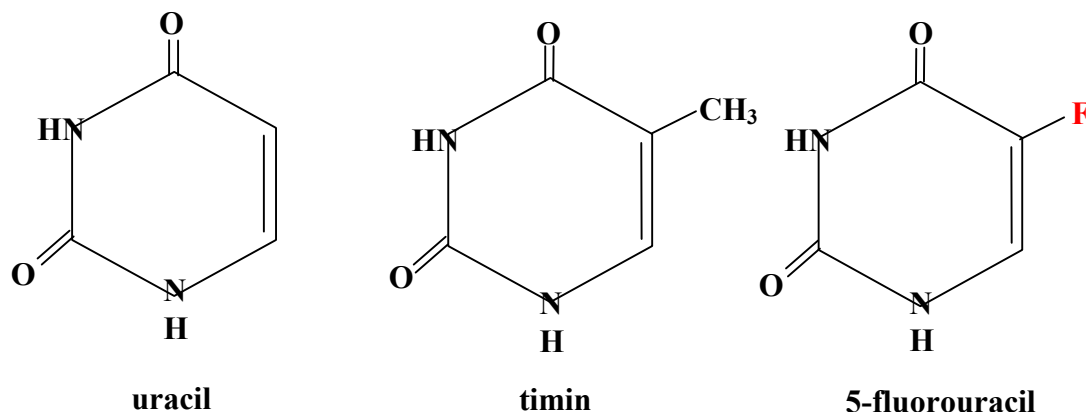
Szájápolási termékek, peszticidek, inszekticidek, valamint különböző fluoridtartalmú gyógyszerek (antibiotikumok, rákellenes szerek, gyermekgyógyászati és pszichiátriai készítmények, gyulladáscsökkentők stb.) is hozzájárulnak a nátrium-fluorid környezetben előforduló mennyiségének drasztikus növekedéséhez (DVORÁKOVÁ-HORTOVÁ ET AL. 2008).

Az Országos Gyógyszerészeti Intézet hivatalos gyógyszer-adatbázisa szerint (Pharmindex) a jelenleg forgalomban kapható nátrium-fluorid tartalmú készítmények – melyek közt tabletták és külsőleg alkalmazandó kenőcsök is megtalálhatóak – hatóanyagtartalma 1 és 22,1 ppm közötti. Ráadásul a fogkrémek és különböző szájápolási termékek fluoridtartalma akár az 1500 ppm-et is elérheti, mely a felszíni vizekben, természetes körülmények közt mérhető fluoridkoncentrációnál nagyságrendekkel nagyobb. A tabletták – a vesén keresztül kiválasztódva a vizelettel –, a kenőcsök – a bőrfelszínről lemosódva –, valamint a fogkrémek a kommunális szennyvízen keresztül, kijuthatnak a természetes vizekbe, mely ökotoxikológiai szempontból aggodalomra adhat okot.

A nátrium-fluorid toxikológiai és ökotoxikológiai hatásairól számos publikáció létezik, viszont az ivartermék minőségére kifejtett hatásával csak pár vizsgálat foglalkozik. Zhang és mtsai (2006) azt tapasztalták, hogy ivóvízzel és táplálékkal szervezetbe jutott nátrium-fluorid 100 mg/l koncentrációban (45 mg/l F^-), az egyedek 6 hetes kitettsége után már szignifikánsan csökkentette a spermiumok motilitását patkányok esetében. Chinoy és Narayana (1994) vizsgálataikat *in vitro* módon, humán spermán végezték, és a nátrium-fluorid 250 mM töménységben, 20 perc expozíció után szignifikánsan csökkentette a hímivarsejtek mozgását.

II. 6. 5-fluorouracil

Az 5-fluorouracil az elemi fluor uracillal alkotott vegyülete, szerkezetét tekintve pirimidin analóg (3. ábra). Kemoterápiás szerek hatóanyagaként szokták alkalmazni antimetabolikus tulajdonsága miatt: 5-fluorodezoxiuridin-monofoszfát formájában a timidilát szintetáz enzim működését és ezáltal a DNS-szintézist gátolja, valamint másik metabolitja, az 5-fluorodezoxiuridin-trifoszfát beépül a riboszomális RNS-be, és leállítja a fehérjeszintézist (LONGLEY & JOHNSTON 2006). Az 5-fluorouracil fázis szintetikus: elsősorban az S-fázisban hat; a hatás különösen a gyorsan szaporodó szövetekben kifejezett (PHARMINDEX).



3. ábra: Az uracil, timin és 5-fluorouracil szerkezeti képlete

Az Országos Gyógyszerészeti Intézet adatbázisa szerint szinte a legtöbb kiserelése (infúziók és kenőcsök) 50 mg/ml hatóanyag tartalmú. Az 5-fluorouracil 7-20%-a a vesén keresztül választódik ki változatlan formában, valamint a kenőcs - lemosódva a kezelt testrészeiről -, kijuthat a környezetbe. A Francia Egészségvédelmi Termékfelügyelet szerint az 5-fluorouracil becsült környezeti koncentrációja 2004-ben 7,72 ng/l, 2008-ban pedig 7,91 ng/l volt. Látható a növekvő tendencia, mely a vegyület egyre növekvő felhasználásából adódik: míg 2004-ben 1690 kg-ot használtak fel, addig 2008-ban már 1733 kg-ot (BESSE ET AL. 2012). Kórházi szennyvízkifolyóknál a koncentrációja ráadásul akár a 122 µg/l-t is elérheti (KOSJEK & HEATH 2011), ami a jövőbeni növekvő felhasználás következtében többszöröződhet. Ez hosszútávon negatív ökológiai következményekkel járhat.

Az Európai Unió 7. kutatási keretprogramja által támogatott CytoThreat pályázat a citosztatikumok mint széles körben használt daganatellenes készítmények környezetre gyakorolt hatásának komplex vizsgálatával foglalkozik. A pályázat futamideje 2011-2014, végrehajtásában 9 partner vesz részt, melyek munkája kiegészíti egymást. A gyógyszerek hatását egyrészt különböző állati és növényi modellszervezetekben (pl. zebradánió, festőkagyló (*Unio pictorum*), nagy vízibolha (*Daphnia magna*) virginiai pletyka (*Tradescantia virginiana*)) klasszikus toxikológiai tesztek segítségével vizsgálják, másrészt a génexpresszió és analitikai kémia szintjén is. A Szent István Egyetem Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet Halgazdálkodási Tanszéke több részfeladat végrehajtásában vesz részt, ebből egynek a felelőse is.

III. ANYAG ÉS MÓDSZER

Kísérleteinket a Szent István Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Környezet- és Tájgazdálkodási Intézetének Halgazdálkodási Tanszékén található zebradániós laboratóriumban végeztük. A kísérlethez AB beltenyésztett vonalból származó, egészséges, ivarérett hím egyedeket használtunk. A halakat kontrollált körülmények között (Zebtec, Techniplast S.p.a., Italy), állandó vízminőségi paraméterek mellett ($25 \pm 0,5^\circ\text{C}$, $\text{pH } 7,4 \pm 0,2$, vezetőképesség $525 \pm 50 \mu\text{S}$), polikarbonát medencékben tartottuk (4. ábra), 14 óra világos: 10 óra sötét ciklust alkalmazva.



4. ábra: A zebradániók tartására használt medencék (Fénykép: saját kép, 2013)

Vizsgálatainkhoz két fluoridtartalmú vegyületet, a nátrium-fluoridot, illetve az 5-fluorouracilt használtuk fel. Kísérleteink végpontja a spermiumsejtek motilitása volt, melynek vizsgálatához a tanszék CASA rendszerét használtuk. A CASA rendszer egy Olympus BX 41 típusú mikroszkópból, egy Magma márkájú adapterdobozból, valamint a hozzá csatlakoztatott Acer notebookon található Sperm Vision 3.5 szoftverből áll (*Minitube GmbH*). A felvételek készítéséhez Makler-kamrát (*Sefi-Medical Instruments ltd.*), valamint 20×-os negatív fáziskontraszt objektívet használtunk.

Kétféle vizsgálatot végeztünk el az alkalmazott vegyületekkel: az *in vivo* vizsgálat során a halak kitettségen keresztül megnyilvánuló, a spermiumok csökkent motilitásában megmutatkozó hatást, valamint az *in vitro* vizsgálat során a vegyületek spermával történő

közvetlen érintkezése okozta motilitásváltozást teszteltük. Az 5-fluorouracil hatásának *in vivo* vizsgálata a CytoThreat pályázat részét képezte. Ezenkívül elvégeztünk egy standardizációs vizsgálatot, mely a kísérleti anyagok *in vitro* vizsgálatának alapjául szolgált.

III. 1. A nátrium-fluorid (NaF) hatása a zebradánió spermiumok motilitására *in vivo*

A kísérlet során 100, 200 és 500 mg/l koncentrációjú NaF (*Merck, B0108549 836*) oldatokban, illetve egy fluoridmentes kontroll csoportban tartottuk a halakat, amelyhez zebradániók tartására alkalmas rendszervizet használtunk. Minden koncentráció esetében a kezelést 2 ismétlésben végeztük, medencénként 5-5 darab, hat hónapos hím egyed felhasználásával. A kísérletet statikus rendszerben, 3 literes medencékben, 96 órás expozíció alkalmazásával végeztük, folyamatos levegőbeporlasztás mellett. A kitettség alatt a halakat nem etettük.

A kísérlet végén az egyedeket MS-222-vel (*tricain-metánszulfonát, Sigma-Aldrich, CAS 886-86-2*) túlaltattuk, majd az agy roncsolása és a gerinchúr átvágása után a halakat szárazra töröltük, a vízzel és vérrel történő kontaminációt megelőzendő. Az egyedek heréit sebészeti úton eltávolítottuk (5. ábra), majd 20 µl, pontyfélénél használt immobilizáló oldatba helyeztük. A szöveteket spatulával óvatosan roncsoltuk annak érdekében, hogy szabaddá váljanak a spermiumsejtek. A vizsgálat megkezdéséig a mintákat 4°C-on tartottuk, majd CASA rendszerrel vizsgáltuk a spermiumok motilitását.



5. ábra: Zebradánió heréinek kivétele (Fénykép: saját kép, 2013)

A CASA vizsgálat során a here szuszpenzióból 5 µl-t pipetta segítségével kivettünk, melyet a mikroszkóp tárgyasztalán elhelyezett Makler-kamrában, 10 µl csapvízzel aktiváltunk. Az aktiválás során a spermamintát - a pipetta hegyével - óvatosan összekevertük a csapvízzel, melyhez előzetesen 1% BSA-t (Albumin bovine serum Cohn Fraction V, *VWR International Ltd.*, CAS: 9048-46-8) kevertünk. Az aktiváció után 30 másodperccel készítettünk felvételt. Mintánként 2 aktivációt végeztünk.

III. 2. Az 5-fluorouracil (5-FU) hatása a zebradánió spermiumok motilitására *in vivo*

Ezen hosszútávú teszt során 0,01, 1 és 100 µg/l koncentrációjú 5-FU (*Sigma-Aldrich*, CAS 51-21-8) oldatokban tartottuk az egyedeket egész életciklusuk alatt, 7 hónapon keresztül. Mivel az 5-FU feloldásához dimetil-szulfoxid (DMSO; *Reanal*, 08860-1-08-65) szükségeltetett, ezért oldószeres kontroll csoport beállítása is történt - a megengedett maximális 100 µg/l koncentrációban -, a rendszervizes kontroll csoport mellett. A kísérletet 2 ismételtsben végeztük, medencénként 5-5 hím egyed felhasználásával. A halakat a 7 hónapos kitettség alatt félstatikus rendszerben, 8 literes medencékben tartottuk, folyamatos levegőbeporlasztás mellett; oldatsere kétnaponta történt. Az expozíció alatt az egyedek etetése hetente kétszer, frissen keltetett *Artemia salina* nauplius-lárvával történt. A 7 hónap elteltével, az egyedek heréinek kivétele a III. 1. fejezetben leírtak szerint történt.

A CASA vizsgálat során a here szuszpenzióból, a minta sűrűségétől függően 1-2 µl-t vettünk ki, melyet 10 µl, pontyfélénél használt aktiváló oldattal aktiváltunk (45 mM NaCl, 5 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8), melyhez előzetesen hozzákevertünk 1% BSA-t. Egy minta vizsgálata során egy aktivációt végeztünk, aktivációnként 6 felvételt készítettünk egy percen belül.

III. 3. A spermavizsgálat során alkalmazható immobilizáló és aktiváló oldatok összehasonlítása

Kísérletünket 5 egyed felhasználásával végeztük el, mely során összehasonlítottunk 2 immobilizáló és 3 aktiváló oldatot. A vizsgált immobilizáló oldatok pontyfélénél alkalmazott immobilizáló oldat (200 mM KCl, 30 mM Tris, pH 8), illetve 300 mOsm/kg ozmolaritású Hanks-féle sóoldat (*Sigma-Aldrich*, H9269) volt. A tesztelt aktiváló oldatok

pontyféléknél használt aktiváló oldat (lásd a III. 2. fejezetben), desztillált víz (vezetőképesség $< 5 \mu\text{S}$), valamint zebradániók tartására használt rendszervíz volt.

Vizsgálatainkhoz 6 hónapos hím egyedeket használtunk fel, melyeket recirkulációs rendszerben, 3 literes medencében, 20-25 fős csoportban tartottunk a kísérletet megelőzően. Az egyedek etetése naponta kétszer mesterséges SDS táppal, valamint kiegészítésként kétnaponta frissen kelteztetett *Artemia salina* nauplius-lárvával történt.

A hímeket MS-222-vel történő túlaltatás után az agy roncsolásával és a gerinchúr átvágásával dekapitáltuk, majd a heréket eltávolítottuk. Egy hím egyik heréjét $10 \mu\text{l}$ ponty immobilizáló oldatba, míg a másikat $10 \mu\text{l}$ Hanks-féle sóoldatba helyeztük, majd a szöveteket spatulával óvatosan roncsoltuk. A mérés megkezdéséig 4°C -on tartottuk a szuszpenziókat.

A CASA vizsgálat során minden aktiválásnál $2 \mu\text{l}$ sperma szuszpenziót aktiváltunk az adott aktiváló oldatban, melyből $10 \mu\text{l}$ -t használtunk. Minden aktiváló oldat tartalmazott 1% BSA-t. Az aktiváció után egy percen keresztül, 10 másodpercenként készítettünk felvételt.

III. 4. A nátrium-fluorid (NaF) spermára kifejtett hatásának vizsgálata *in vitro*

Ebben a kísérletben 500, 1000 és 5000 mg/l koncentrációjú NaF-oldatok spermiumok motilitására gyakorolt direkt hatását vizsgáltuk. A kísérlethez egyedi spermamintákat használtunk fel. A különböző koncentrációjú NaF-oldatokat immobilizáló oldat segítségével kevertük ki, így az expozíció alatt a sejtek nem veszítették el motilitási képességüket. A kontroll mintákat immobilizáló oldattal hígítottuk. A 2 órás expozíció alatt félóránként vizsgáltuk a spermiumok progresszív motilitását. A vizsgálatot 5 ismétlésben végeztük el.

A hím ivarterméket nem invazív módon, az egyedek abdominális masszázssal nyertük. A spermagyűjtést megelőzően altatást végeztünk az egyedeken, melyhez MS-222-t alkalmaztunk: 400 mg tricaint feloldottunk $97,9 \text{ ml}$ desztillált víz és $2,1 \text{ ml}$ 1 molos Tris (pH 9) keverékében. A kapott törzsoldatból $4,2 \text{ ml}$ -t oldottunk fel 100 ml rendszervízben. Ebben a keverékben altattuk el egyesével a hím egyedeket; hozzávetőlegesen 1-1,5 perc alatt kábultak el a halak. Altatás után a hímeket egyesével, egy szivacson ejtett nyílásba fektettük a hátukra fordítva, ezáltal rögzítettük az egyedeket a hasukkal felfelé, a fejest megkönnyítendő. Az egyedek ivarnyílását papírtörölő segítségével szárazra töröltük, ezzel megelőzve a sperma vízzel történő kontaminációját. A fejest mikroszkóp segítségével, $1\times$ nagyítás alatt végeztük el. Egy, a végén görbülettel rendelkező csipesszel óvatosan nyomást gyakoroltunk a hasfalra. Az ivarnyíláshoz tartott kapilláris cső (*World Precision Instruments, Inc., 1B100F-3*)

segítségével felszívtuk a hímek által leadott spermát (6. ábra). A spermavétel után az egyedeket visszahelyeztük a medencékbe; a következő fejésig átlagosan 2-3 nap telt el.



6. ábra: Az ivartermék kinyerése. (Fénykép: Horváth Ákos, 2010)

Minden koncentráció, és a kontroll csoport esetében is, 10:1 arányban hígítottuk a spermát immobilizáló oldattal, amely a kontroll csoport kivételével már tartalmazta a NaF-ot az alkalmazott koncentrációkban. A kapilláris segítségével lefejt ivarterméket – mely körülbelül 1 μ l volt egyedenként - 10 μ l immobilizáló oldatba kevertünk.

A sperma különböző koncentrációjú NaF-oldatokba juttatását követően, 2 órán keresztül, 30 percenként vizsgáltuk a sejtek progresszív motilitását. A mérések között 4°C-on tartottuk az ivarterméket. A számítógépes spermavizsgálat során, a spermiumok aktiválásához desztillált vizet használtunk: 5 μ l – a mikroszkóp tárgylemezére pipettázott - desztillált vízbe 1 μ l spermaszuszpenziót juttattunk. Mintánként, az adott mérési időpontban 2 aktivációt végeztünk, az aktiváció után 15 másodperccel készítettünk felvételt.

III. 5. Az 5-fluorouracil (5-FU) spermára kifejtett hatásának vizsgálata *in vitro*

Ebben a kísérletben 0,1, 1 és 10 mg/l koncentrációjú 5-FU oldatok spermára kifejtett direkt hatását vizsgáltuk. Mivel az 5-FU nem vízdékony vegyület, így a feloldásához DMSO-t alkalmaztunk, emiatt szükség volt oldószeres kontroll csoport beállítására is. Az oldószeres kontroll csoport, valamint a különböző koncentrációjú 5-FU oldatok mindegyike egységesen 100 μ l DMSO-t tartalmazott 50 ml immobilizáló oldatban. Ahogy az előző kísérletnél, itt is egyedi spermamintákkal dolgoztunk. Az alkalmazott koncentrációkat pontyféle immobilizáló oldat segítségével kevertük ki. A kontroll mintákat immobilizáló

oldattal hígítottuk. Kísérletünket 5 ismételtsben végeztük el. A 2 órás expozíció alatt fél óránként végeztünk motilitási méréseket.

Az egyedek vizsgálat előtti tartási körülményei a III. 3. fejezetben leírtakkal megegyezik. A spermagyűjtés a III. 4. fejezetben leírtak szerint történt. Minden koncentráció, és a kontroll csoportok esetében is, 10:1 arányban hígítottuk a spermát immobilizáló oldattal, mely a kontroll és a pozitív kontroll csoport kivételével már tartalmazta az 5-FU-t az alkalmazott koncentrációkban. A lefejt ivarterméket – mely körülbelül 1 µl volt egyedenként - 10 µl immobilizáló oldatba kevertünk. A spermiumok motilitásának mérése megegyezik a III. 4. fejezetben leírtakkal.

III. 6. Az eredmények feldolgozása

Az eredmények értékelését Graphpad Prism, valamint SPSS statisztikai programokkal végeztük, az alábbi tesztek végrehajtásával:

- III. 1. vizsgálat: Az adatok normalitásvizsgálatát Shapiro-Wilk-próba segítségével végeztük el, majd egytényezős variancia-analízist (ANOVA) alkalmaztunk.
- III. 2. vizsgálat: Az adatok normalitásvizsgálatát Shapiro-Wilk-próba segítségével végeztük el. A kontroll és oldószeres kontroll csoportok összehasonlításához Mann-Whitney-próbát használtunk, majd egytényezős variancia-analízist végeztünk, post hoc tesztként Dunnett-próba alkalmazásával.
- III. 3. vizsgálat: Az adatok normalitásvizsgálatát Kolmogorov-Szmirnov-próba segítségével végeztük el. Ezután többtényezős variancia-analízist alkalmaztunk, post hoc tesztként Bonferroni-próba használatával, illetve egy esetben (50. másodperc) Kruskal-Wallis-próba segítségével értékeltük ki az eredményeket.
- III. 4. vizsgálat: Az adatok normalitásvizsgálatát Kolmogorov-Szmirnov-próbával végeztük el. Ezután egytényezős variancia-analízist végeztünk, post hoc tesztként Dunnett-próba alkalmazásával.
- III. 5. vizsgálat: Az adatok normalitásvizsgálatát Kolmogorov-Szmirnov-próbával végeztük el. A kontroll és oldószeres kontroll csoportok összehasonlításához Mann-Whitney-próbát használtunk. Ezután egytényezős variancia-analízist végeztünk, post hoc tesztként Dunnett-próba alkalmazásával, illetve egy esetben (120. perc) Kruskal-Wallis-próba segítségével értékeltük ki az eredményeket.

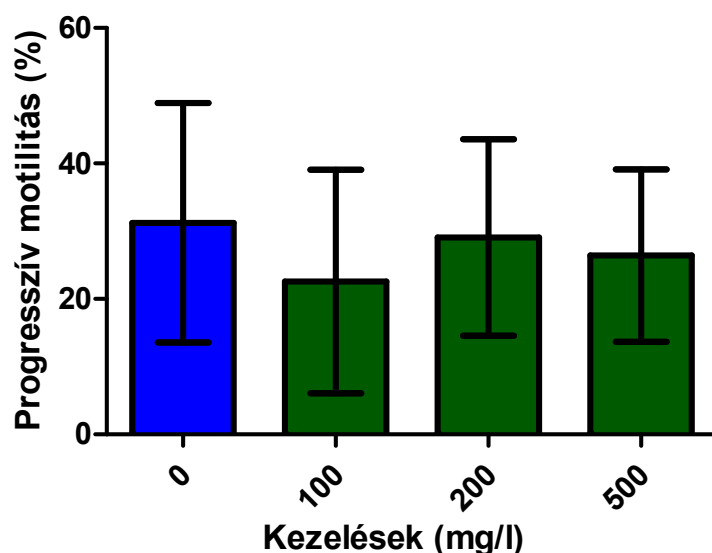
A szignifikanciaszint minden esetben $p=0,05$ volt.

IV. EREDMÉNYEK

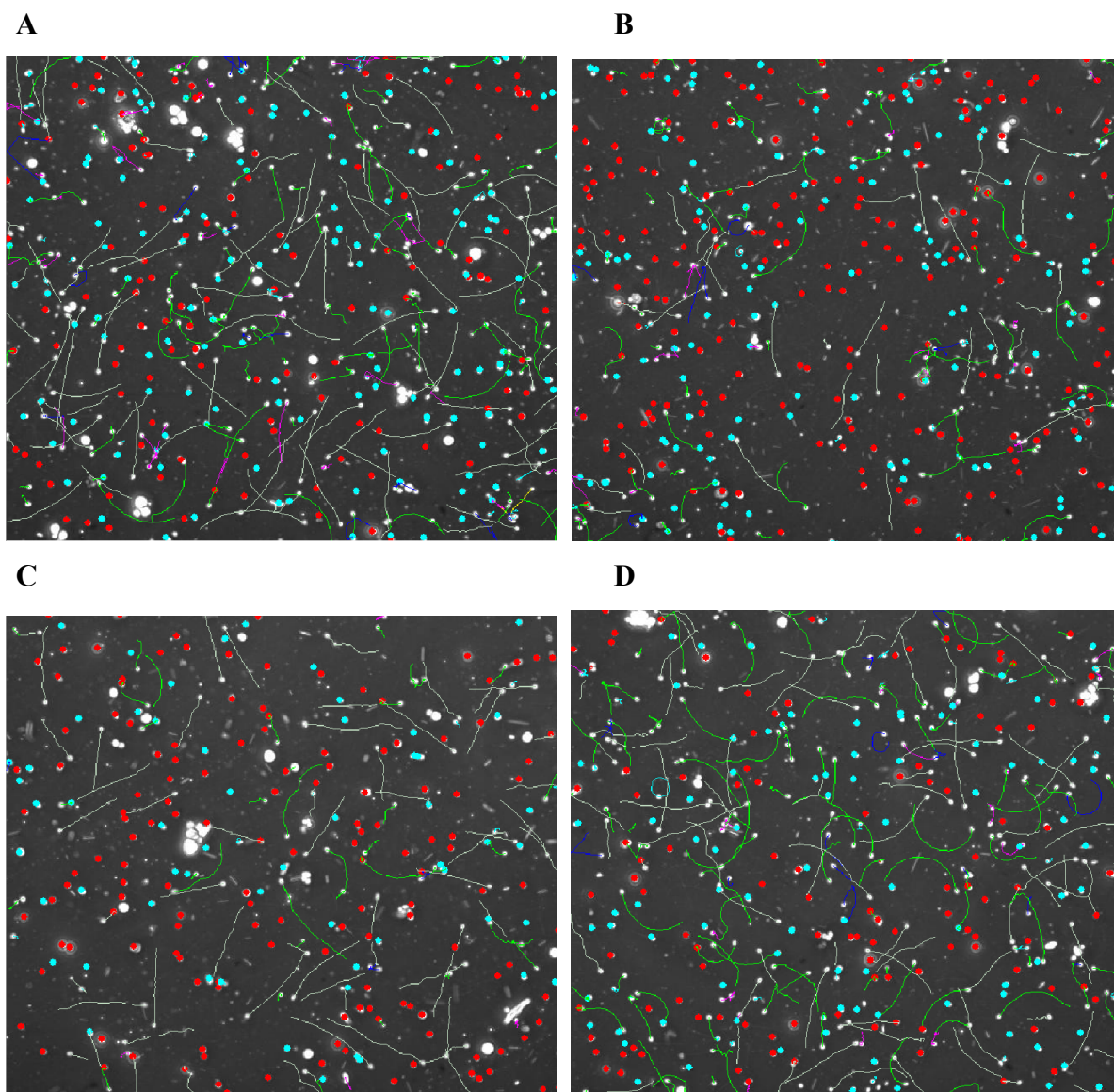
IV. 1. A nátrium-fluorid (NaF) hatása a zebradánió spermiumok motilitására *in vivo*

Vizsgálatainkhoz 40 hím egyedét használtunk fel (4 kezelés $\times$ 5 hím $\times$ 2 ismétlés), így összesen 80 motilitásmérést végeztünk el a mintánkénti 2 aktiváció miatt. Az egyik kontroll csoport szélsőségesen alacsony motilitási értékeket mutatott, így az eredmények feldolgozásánál ezeket az értékeket elhagytuk. A 100 és 200 mg/l koncentrációban volt 1-1 kiugró érték, ezeket szintén nem vettük figyelembe a statisztika során. Az egyedek spermavizsgálata során elvégzett két aktiválás során kapott motilitási értékek számtani átlagát képeztük az eredmények kiértékelésekor.

A kontroll csoport átlagos $31,25 \pm 17,69\%$ progresszív motilitásához hasonlóan, 100 mg/l koncentrációban $22,58 \pm 16,52\%$, 200 mg/l koncentrációban $29,08 \pm 14,5\%$, 500 mg/l koncentrációban pedig $26,41 \pm 12,73\%$ progresszív motilitás volt tapasztalható. A variancia-analízis szerint a NaF nincs szignifikáns hatással a spermiumok progresszív motilitására az alkalmazott koncentrációkban ($p=0,7178$, 7. ábra). A 8. ábrán egy-egy zebradánió spermájának CASA rendszerrel történő analízise látható, reprezentatív jelleggel.



7. ábra: A NaF hatása a zebradánió spermiumok progresszív motilitására

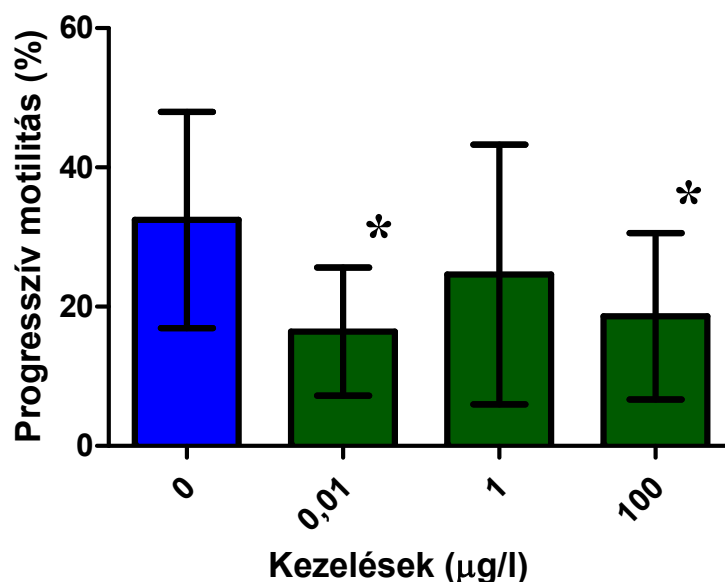


8. ábra: CASA rendszerrel készített felvételek a különböző koncentrációjú NaF-oldatokban tartott egyedektől származó spermiumok progresszív motilitásáról. **A:** kontroll, **B:** 100 mg/l, **C:** 200 mg/l, **D:** 500 mg/l. Piros: immotilis sejtek, világoskék: lokálisan mozgó sejtek, zöld: progresszív mozgás, fehér: lineáris mozgás, lila: nemlineáris mozgás, sötétkék: körkörös mozgás (Fénykép: saját kép, 2013).

IV. 2. Az 5-fluorouracil (5-FU) hatása a zebradánió spermiumok motilitására *in vivo*

Vizsgálatainkhoz 50 hím egyed használtunk fel (5 kezelés $\times$ 5 hím $\times$ 2 ismétlés), így összesen 300 motilitásmérést végeztünk a mintánkénti 6 felvétel elkészítése során. A 0,01 $\mu\text{g/l}$ -es csoportba eggyel kevesebb hím – így összesen 9 egyed –, a 100 $\mu\text{g/l}$ -es csoportba pedig eggyel több hím – így összesen 11 egyed – került. Az egyedek spermavizsgálata során elvégzett hat mérés számtani átlagát képeztük az eredmények kiértékelésekor.

A kontroll csoport esetében átlagosan $35,84 \pm 12,87\%$, a pozitív kontroll csoportban $29,07 \pm 17,79\%$, $0,01 \mu\text{g/l}$ koncentrációban $16,41 \pm 9,19\%$, $1 \mu\text{g/l}$ koncentrációban $24,63 \pm 18,64\%$, míg $100 \mu\text{g/l}$ koncentráció esetében $18,62 \pm 11,96\%$ progresszív motilitást tapasztaltunk. Mivel a kontroll és oldószeres kontroll csoport nem különbözött szignifikánsan egymástól ($p=0,1611$), ezért ezt a két csoportot összevontuk a statisztikai elemzés során, az így képzett kontroll csoport motilitása $32,45 \pm 15,51\%$ volt. Az variancia-analízis szerint az 5-FU szignifikáns hatással van a spermiumsejtek progresszív motilitására ($p=0,0233$). A post hoc teszt $0,01 \mu\text{g/l}$ ($p=0,025$) és $100 \mu\text{g/l}$ ($p=0,042$) koncentráció esetében mutatott ki szignifikáns különbséget. A középső, $1 \mu\text{g/l}$ koncentráció esetében nem tapasztaltunk szignifikanciát ($p=0,408$, 9. ábra).



9. ábra: Az 5-FU hatása a zebradánió spermiumok progresszív motilitására (* jelöli a szignifikáns különbséget)

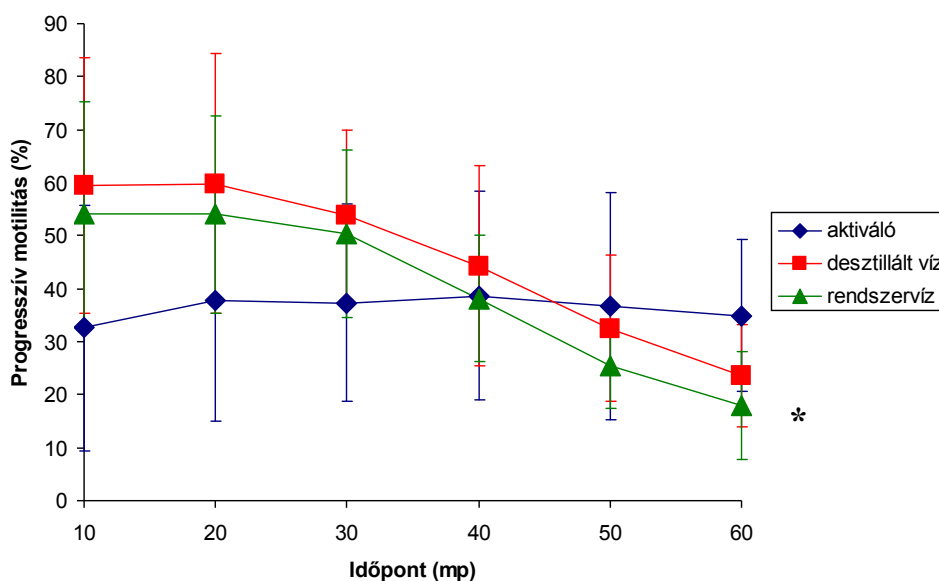
IV. 3. A spermavizsgálat során alkalmazható immobilizáló és aktiváló oldatok összehasonlítása

Vizsgálatainkhoz 5 hím egyedet használtunk fel az 5 ismétlés miatt, így összesen 180 motilitásmérést végeztünk el a különböző időpontokban ($2 \text{ immobilizáló} \times 3 \text{ aktiváló} \times 6 \text{ időpont} \times 5 \text{ ismétlés}$).

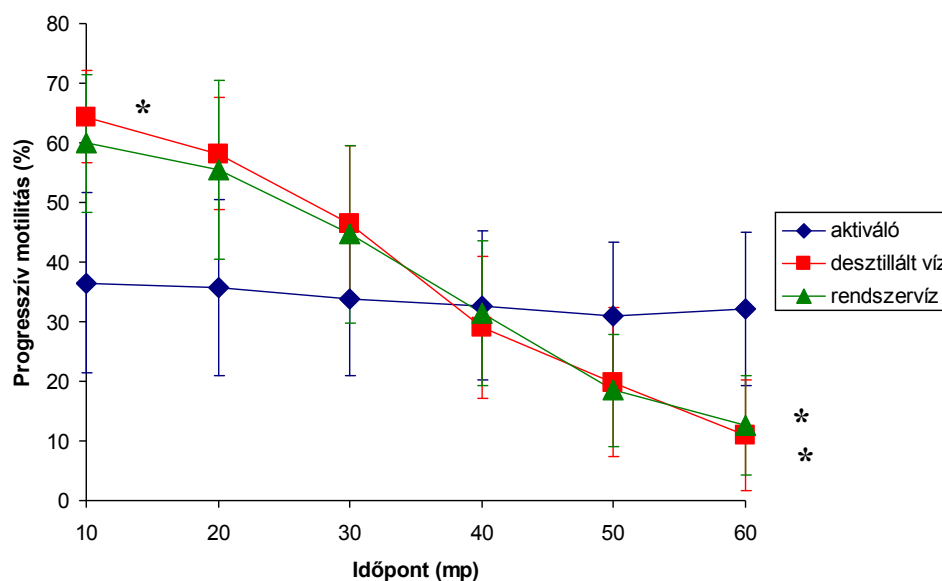
Pontyféle aktiváló oldat alkalmazása során, pontyféle immobilizáló oldattal immobilizálva 10 másodpercnél $32,55 \pm 23,21\%$, 60 másodpercnél pedig $34,85 \pm 14,36\%$ progresszív motilitást tapasztaltunk. Hanks-féle sóoldattal történő immobilizálás esetén

36,5±15,17%, valamint 32,14±12,86% motilitást mértünk a vizsgálat kezdetén és végén. Aktiváló oldat alkalmazásával nem változott számottevően a motilitás az egy perces vizsgálati periódus alatt, egyik immobilizáló oldat esetében sem. Desztillált vízzel történő aktiválás során, immobilizáló oldat esetében 10 másodpercnél 59,45±24,19%, 60 másodpercnél 23,51±9,7% progresszív motilitást mértünk, míg Hanks-féle sóoldattal immobilizálva 64,34±7,68%, valamint 10,88±9,26% motilitást tapasztaltunk 10, illetve 60 másodpercnél. Rendszervízzel aktiválva, immobilizáló oldat esetében a vizsgálat kezdetén 54,02±21,17%, a vizsgálat végén pedig 17,97±10,12% volt a progresszív motilitás. Hanks-féle sóoldattal immobilizálva 10 másodpercnél 59,91±11,53%, 60 másodpercnél pedig 12,57±8,37% motilitást mértünk. Desztillált vízzel és rendszervízzel történő aktiválás esetében is az idő előrehaladtával megfigyelhető csökkenő tendencia a motilitásban, mindkét immobilizáló oldat esetében.

Az eredmények statisztikai értékelését időpontonkénti bontásban végeztük el. Egyik mérési időpontban sem volt szignifikáns különbség az alkalmazott immobilizáló oldatok között ($p>0,05$). Az aktiváló oldatok összehasonlítása során viszont tíz és hatvan másodpercnél szignifikáns különbséget tapasztaltunk ($p=0,0173$ és $p=0,0176$): pontyféle aktiváló oldathoz képest a desztillált vízzel aktivált minták motilitása szignifikánsan eltért ($p<0,05$) Hanks-féle sóoldattal történő immobilizálás esetében, ráadásul hatvan másodpercnél a rendszervízzel történő aktiválás is szignifikanciát mutatott, mindkét immobilizáló oldat esetében ($p<0,05$; 10., 11. ábra).



10. ábra: Pontyféle immobilizáló oldattal kezelt minták különböző aktiváló oldatokkal történő aktiválása során kapott progresszív motilitási értékek (*jelöli a szignifikáns különbséget)



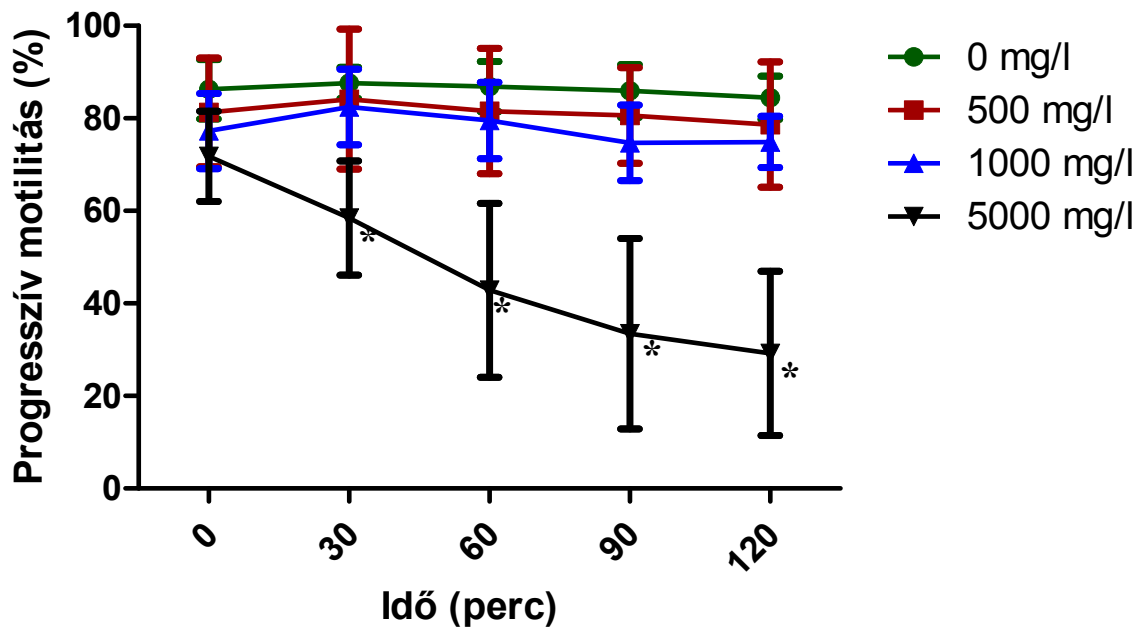
11. ábra: Hanks-féle sóoldattal immobilizált minták különböző aktiváló oldatokkal történő aktiválása során kapott progresszív motilitási értékek (* jelöli a szignifikáns különbséget)

IV. 4. A nátrium-fluorid (NaF) spermára kifejtett hatásának vizsgálata *in vitro*

Vizsgálatainkhoz összesen 20 spermamintát használtunk fel (4 kezelés $\times$ 5 ismételés), így a különböző időpontokban összesen 200 mérést végeztünk (20 minta $\times$ 5 időpont $\times$ 2 aktiváció). Az adott mérési időpontokban elvégzett két aktiválás motilitási eredményeinek számtani közepét vettük az eredmények kiértékelése során.

A kontroll csoportban a vizsgálat kezdetekor $86,27 \pm 6,41\%$, a 2 órás expozíció végén pedig $84,47 \pm 4,64\%$ progresszív motilitást mértünk. A legkisebb, 500 mg/l koncentráció esetében a 0. percben $81,32 \pm 11,74\%$, a 120. percben pedig $78,66 \pm 13,54\%$ motilitást tapasztaltunk. Ehhez hasonlóan, 1000 mg/l koncentráció esetében a vizsgálat kezdetén mért progresszív motilitás $77,27 \pm 8,12\%$, a végén pedig $74,91 \pm 5,57\%$ volt. A legnagyobb, 5000 mg/l koncentráció esetében a 0. percben $71,81 \pm 9,76\%$, a 120. percben pedig $29,25 \pm 17,75\%$ progresszív motilitást tapasztaltunk.

Az eredményeket időpontenkénti bontásban értékeltük. A mérés 0. percében nem volt szignifikáns különbség egyik koncentráció esetében sem ($p=0,056$). A kitettség 30. percétől kezdve viszont már szignifikáns különbséget tapasztaltunk minden mérési időpontban ($p<0,05$): a post hoc teszt a legnagyobb koncentráció, 5000 mg/l esetében mutatott szignifikanciát ($p<0,05$; 12. ábra).



12. ábra: Különböző koncentrációjú NaF-oldatok hatása a spermiumok progresszív motilitására, az idő függvényében (* jelöli a szignifikáns különbséget)

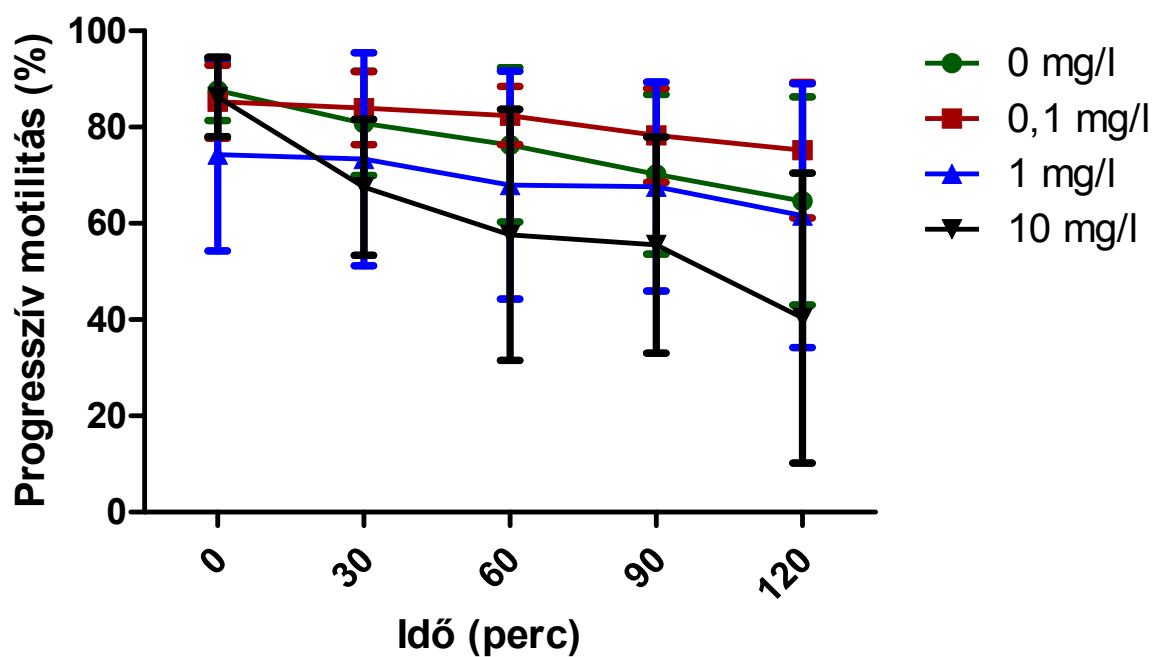
IV. 5. Az 5-fluorouracil (5-FU) spermára kifejtett közvetlen hatásának vizsgálata

Vizsgálatainkhoz összesen 25 spermamintát használtunk fel (5 kezelés $\times$ 5 ismételés), így a különböző időpontokban összesen 250 mérést végeztünk (25 minta $\times$ 5 időpont $\times$ 2 aktiváció). Az adott mérési időpontokban elvégzett két aktiválás motilitási eredményeinek számtani közepét vettük az eredmények kiértékelése során.

A kontroll csoport esetében a vizsgálat kezdetekor $89,35 \pm 4,8\%$, a vizsgálat végén pedig $77,96 \pm 18,02\%$ progresszív motilitást mértünk. Az oldószeres kontroll csoportban mért értékek $85,82 \pm 7,51\%$, valamint $51,36 \pm 16,98\%$ volt a 0., illetve 120. percben. A legkisebb, 0,1 mg/l koncentráció esetében $85,32 \pm 7,59\%$, valamint $75,19 \pm 14,08\%$ progresszív motilitást tapasztaltunk a vizsgálat kezdetén és végén. Ehhez hasonlóan, 1 mg/l koncentráció esetében a 0. percben $74,33 \pm 20,05\%$, a 120. percben pedig $61,62 \pm 27,43\%$ motilitást mértünk. A legnagyobb, 10 mg/l koncentráció esetében a vizsgálat kezdetén $86,32 \pm 8,25\%$, a vizsgálat végén pedig $40,34 \pm 30,16\%$ progresszív motilitást tapasztaltunk.

Az eredményeket időpontenkénti bontásban értékeltük. A kontroll és az oldószeres kontroll csoport nem különbözött szignifikánsan egymástól egyik mérési időpontban sem ($p > 0,05$), így ezt a két csoportot összevontuk a statisztikai elemzés során. A variancia-analízis

nem mutatott ki szignifikáns különbséget a koncentrációk között egyik mérési időpontban sem ($p>0,05$; 13. ábra).



13. ábra: Különböző koncentrációjú 5-FU-oldatok hatása a spermiumok progresszív motilitására, az idő függvényében

V. ÉRTÉKELÉS ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

Az általunk elvégzett vizsgálatok célja a nátrium-fluorid (NaF) és az 5-fluorouracil (5-FU) spermiumok motilitására gyakorolt hatásának feltérképezése, valamint a zebradánio sperma toxikológiai célú vizsgálatának fejlesztése volt. A fluoridvegyületek hatását négy kísérlet során vizsgáltuk: mindkét anyagot teszteltük *in vivo* és *in vitro* módon egyaránt. A vizsgálatok elvégzéséhez különböző módszereket választottunk azért, hogy alkalmazhatóságukat összehasonlíthassuk, mely egy jövőbeni spermavizsgálati protokoll leírásának alapja lehet.

A nátrium-fluorid *in vivo* vizsgálata során a 96 órás expozíció nem eredményezte a spermiumok motilitásának csökkenését 100, 200 és 500 mg/l koncentráció esetében sem. Ez a kísérlet, a kevés koncentráció és a nagy lépték miatt dóziskereső (range finding) vizsgálatnak fogható fel. Mivel Zhang és mtsai (2006) a patkányok 6 hetes kitettsége után, 100 mg/l koncentráció esetében a spermiumok csökkent motilitásáról számoltak be, ezért javasolt további vizsgálatok elvégzése az expozíció időtartamának növelésével, esetleg több koncentráció beállításával.

Ezzel szemben a sperma közvetlen kitettsége esetén, 5 g/l koncentrációban a vizsgálat 30. percétől kezdve folyamatos motilitáscsökkenést mértünk, mely a 120. percre a kezdeti motilitás töredékére csökkent. Ez egybevág Chinoy és Narayana (1994) humán spermán végzett megfigyeléseivel, ahol 10,5 g/l NaF 20 perc expozíció után csökkentette a hímivarsejtek mozgását. A kevés koncentráció és a nagy lépték miatt ezen vizsgálatunk is dóziskereső vizsgálatként funkcionál. Javasolt további vizsgálatok elvégzése kisebb lépték, valamint 5 g/l alatti és feletti koncentrációk alkalmazásával, hogy pontosabb képet nyerjünk a NaF spermatoxikológiai hatásáról. A sperma NaF-ot tartalmazó immobilizáló oldatban történő inkubálása – a szeminális plazmával megegyező ozmolaritás miatt – felfogható a herében végbemenő expozíció modellezéseként. Ennek értelmében az egyedek szervezetében kialakuló 5 g/l NaF-koncentráció már 30 perc után szignifikánsan csökkenti a spermiumok motilitását. Fluoriddal erősen szennyezett területeken (pl. vulkanikus területek, mezőgazdasági művelés alatti területek) már rövid távon negatív ökológiai következményekkel járhat: reprodukciós problémákhoz, valamint a termékenység csökkenéséhez vezethet halak esetében.

Az 5-fluorouracil *in vivo* vizsgálata során a spermiumok motilitásának csökkenését tapasztaltuk, viszont a hatás nem volt minden koncentráció esetében szignifikáns. Ebből kifolyólag javasolt egy kisebb léptékű, több koncentrációt alkalmazó vizsgálat elvégzése, a

spermatoxikológiai hatás pontosabb feltérképezésére. Kísérletünk során az 5-FU 10 ng/l koncentrációban már a spermiumok csökkent motilitását eredményezte, ami megközelíti a környezetben már több alkalommal mért koncentrációt. Ennek hosszú távú ökotoxikológiai hatása megnyilvánulhat a halak csökkent termékenyítő képességében.

Az 5-fluorouracil spermára gyakorolt direkt hatásának vizsgálata során a statisztika nem mutatott ki szignifikáns különbséget egyik vizsgált koncentráció esetében sem a 2 órás expozíció alatt, viszont a legnagyobb, 10 mg/l koncentráció esetében látható némi csökkenő tendencia az idő előrehaladtával. Emiatt javasolt további kísérletek elvégzése hosszabb expozíció, valamint több koncentráció alkalmazásával. Az intratesztikuláris kitettség analógiájára elvégzett kísérletből azt a következtetést vontuk le, hogy az 5-FU rövid távon nem eredményezi a hímivarsejtek mozgásának csökkenését; spermatotoxikus hatását hosszú távon fejt ki, melyhez – ahogy az előző kísérlet eredményeiből is látszik – alacsonyabb koncentráció is elegendő. Ez a hatása tulajdonképpen érthető, hiszen az 5-FU alavető szerepe a timidilát szintetáz enzim működésének gátlása. Ez az enzim felelős a timidin, mint a DNS replikáció számára alapvető DNS építőkö szintéziséért. Hiányában a DNS megkettőződése az osztódás során lehetetlenné válik (LONGLEY ET AL. 2003). Az érett spermiumokban DNS replikáció nem zajlik, így az 5-FU fő funkcióját sem tudja kifejteni.

A rendelkezésre álló szakirodalmat áttekintve megállapítható, hogy nem létezik olyan standard eljárás, mely a zebadánió-sperma vizsgálatára alkalmas lenne. Emiatt kísérleteinkkel egyidejűleg megkezdtuk egy olyan módszer kidolgozását, amelyet bárhol, bármikor elvégezve megközelítőleg azonos motilitási eredményre számíthatunk. Ennek első lépcsője az alkalmazható immobilizáló és aktiváló oldatok összehasonlítása volt. E vizsgálat során megállapítottuk, hogy az aktiválás utáni motilitásmérés időpontja határozza meg azt, hogy melyik immobilizáló-aktiváló oldatkombináció alkalmazásával lehet a legnagyobb motilitást elérni. Az immobilizáló oldatokat összehasonlítva egyik mérési időpontban sem tapasztaltunk szignifikáns különbséget, bár 20 másodperctől kezdve minden mérési időpontban magasabb motilitás volt mérhető pontyféle immobilizáló oldat alkalmazásával. Az aktiváló oldatokat összehasonlítva elmondható, hogy pontyféle aktiváló oldat alkalmazásával a spermiumok motilitása nem változik számmottevően az aktiválás után: egy percen keresztül szinte azonos szinten marad, bár ez az érték jelentősen alacsonyabb, mint a másik két aktiváló oldattal tapasztalt kezdeti motilitás. Rendszervízzel aktiválva a desztillált vizes aktivációhoz közeli értékeket kaptunk, de ezen értékek minden esetben alulmaradtak a desztillált vízzel szemben. Ez érthető is, hiszen a desztillált víz ozmolaritása jóval alacsonyabb a rendszervízhez képest, mivel nem tartalmaz ionokat – ahogy az a vezetőképességből is

látszik. A desztillált vizes és a rendszervizes aktiváció során a kezdeti, szignifikánsan magas progresszív motilitás az idő előrehaladtával fokozatosan csökken, ami az aktivációt követő 40. másodperc környékén eléri az aktiváló oldattal mért motilitás értékét, majd szignifikáns mértékben az alá csökken. Wilson-Leedy és mtsai (2009) is a vízzel történő aktiváció esetében fokozatos motilitáscsökkenést tapasztaltak – megfigyeléseink ezzel egyezők. Mindebből arra a következtetésre jutottunk, hogy ha a motilitás mérését az aktivációt követő tíz másodpercen belül szeretnénk elvégezni, akkor legcélszerűbb a mintát Hanks-féle sóoldattal immobilizálni, valamint desztillált vízzel aktiválni. Ha húsz és negyven másodperc között szeretnénk motilitásmérést végezni, akkor immobilizáló oldat és desztillált víz kombinációjával tudjuk a legnagyobb motilitást elérni. Ötven másodperc után pedig a pontyféle immobilizáló és aktiváló oldat alkalmazása eredményezi a legnagyobb motilitást. Viszont számolni kell azzal, hogy vízzel történő aktiválás után, az idő előrehaladtával jelentősen csökken a motilitás, a túl korán elvégzett mérés pedig – a folyadék sodródása miatt – félrevezető információval szolgálhat a spermiumok motilitási képességét tekintve. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az aktiválás után 15 másodperccel már teljes mértékben megszűnik a folyadék sodródása, viszont a motilitás még nem csökken számottevően, emiatt ez a mérési időpont ideálisnak tekinthető, amelyhez – a fentebb leírtaknak megfelelően – pontyféle immobilizáló oldat és desztillált víz alkalmazandó.

A nátrium-fluorid és az 5-fluorouracil *in vivo* és *in vitro* vizsgálata során alkalmazott kontroll csoportok motilitási értékeit összevetve megállapítható, hogy az egyedek heréinek sebészi úton történő eltávolításával lényegesen alacsonyabb motilitás mérhető, mint a hímek ivartermékének lefejtésével, mely megegyezik Jing és mtsai (2009) megfigyelésével. A spermiumsejtek heréből történő kinyerése során alkalmazott szövetroncsolás a hímivarsejteket is roncsolja, mely a motilitási képesség elvesztésével jár. A zebradániók fejése - amellett, hogy lényegesen magasabb motilitást eredményez - nem teszi szükségessé az egyedek elpusztítását, ezáltal egy olyan, szelektált állomány létrehozására nyílik lehetőség, melyet rendszeresen fejve nagy mennyiségű ivartermékhez lehet jutni. A hímek azonos körülmények közötti tartásával az egyedi különbségek minimálisra csökkenthetőek. Nem mellékesen pedig állatvédelmi szempontból is kedvezőbb az ivartermék nem invazív módon történő kinyerése. Jing és mtsai (2009) szerint a fejés során több egyed ivartermékének összekeverése, poolozás alkalmazandó annak érdekében, hogy egy vizsgálathoz elegendő mennyiségű spermához jussunk. Megfigyeléseink ennek ellentmondanak: a fluoridvegyületek *in vitro* vizsgálata során egyedi spermamintákkal dolgoztunk, és kísérleteink sikeresnek mondhatóak.

A hígítási arányok tekintetében elmondható, hogy az immobilizálás során alkalmazott 1:10 arány, valamint az aktiválás során alkalmazott 1:5 arány, így összességében a sperma 1:50 arányú hígítása alkalmas a motilitás vizsgálatának elvégzéséhez. Ilyen arányú hígítás esetén a mikroszkóp látóterében megfelelő, 100 és 300 közötti darabszámú sejt látható, melyek motilitásának százalékos eredménye korrekt információval szolgál a sperma minőségét tekintve.

V. 2. Következtetések

Az általunk elvégzett kísérleteket tekintve az alábbi következtetéseket lehet levonni:

- Olyan releváns információkra tettünk szert a nátrium-fluorid és az 5-fluorouracil zebradanió – ezáltal a halak - termékenységet befolyásoló hatásáról, melyről ezidáig nem volt szakirodalmi adat. Az eredmények pontosítása végett további vizsgálatok szükségesek, de ezen kísérletekből is látszik a két fluoridtartalmú vegyület jövőbeni növekvő felhasználásának hosszú távú ökológiai hatása.
- Vizsgálataink során fontos lépéseket tettünk a zebradanió sperma toxikológiai célú vizsgálatának optimalizálására, mely a későbbiekben egy egységes halsperma-vizsgálati toxikológiai teszt alapja lehet.

VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A spermiumok motilitása szoros korrelációban áll a termékenyítő képességgel. A hímivarsejtek mozgásának intenzitására és időtartamára a különböző szennyezőanyagok közvetlenül, vagy a halak kitettségén keresztül közvetve, hatással lehetnek, emiatt toxikológiai tesztek végpontjaként szolgálhat.

A számítógépes spermavizsgálat (Computer Assisted Sperm Analysis) gyors és objektív mód a sperma minőségének megállapítására. Az eljárás segítségével standardizálható a spermavizsgálat, ezáltal a különböző toxikus anyagok spermára gyakorolt hatása kvantitatív módon becsülhető. Vizsgálataink e standardizációs folyamat kezdetei lépései. Kísérleteink során két fluoridtartalmú vegyület, a nátrium-fluorid (NaF) és az 5-fluorouracil (5-FU) spermiumok motilitására kifejtett hatását teszteltük *in vivo* és *in vitro* módon. Vizsgálatainkat zebradánió (*Danio rerio*) fajban végeztük el.

A vegyületek tesztelése során – mind az *in vivo*, mind az *in vitro* vizsgálat esetén – 3 koncentrációt, valamint egy kontroll csoportot vizsgáltunk. A NaF *in vivo* vizsgálata során 100, 200 és 500 mg/l koncentrációkat alkalmaztunk koncentrációnként 5 hím felhasználásával, 2 ismétlésben, 96 órás expozíciót alkalmazva. A NaF *in vitro* vizsgálata során 0,5, 1 és 5 g/l koncentrációkat teszteltünk a 2 órás expozíció során, 5 ismétlésben. Az 5-FU *in vivo* vizsgálata során 0,01, 1 és 100 µg/l koncentrációkat teszteltünk a halak 7 hónapos kitettsége alatt. Az 5-FU *in vitro* vizsgálata során 0,1, 1 és 10 mg/l koncentrációk hatását vizsgáltuk a 2 órás expozíció alatt, 5 ismétlés alkalmazásával. Az 5-FU vizsgálata során oldószeres kontroll csoport (DMSO) beállítása is történt. Az *in vivo* kísérletek végén a halak heréit eltávolítottuk, pontyféléknél használt immobilizáló oldatba helyeztük (200 mmol KCl, 30 mmol Tris, pH 8), pépesítettük, majd az ivarterméket számítógépes spermavizsgálatnak vetettük alá. A sperma aktiválásához NaF esetében csapvizet, míg az 5-FU vizsgálata során pontyféléknél használt aktiváló oldatot (45 mmol NaCl, 5 mmol KCl, 30 mmol Tris, pH 8) használtunk. Az *in vitro* vizsgálat során a vegyületek immobilizáló oldatba voltak keverve, ebbe juttattuk a lefejt spermát, majd félóránként vizsgáltuk a spermiumok motilitását. Az aktiváláshoz mindkét anyag tesztelése során desztillált vizet használtunk. A standardizációs folyamat fontos lépéseként összehasonlítottunk két immobilizáló oldatot, továbbá három aktiváló oldatot. A vizsgált immobilizáló oldatok a pontyféléknél használt immobilizáló oldat, valamint a Hanks-féle sóoldat volt. A három aktiváló oldat a pontyféléknél használt aktiváló oldat, desztillált víz, valamint a zebradániók tartására használt rendszervíz (25°C, pH 7,0 ± 0,2, vezetőképesség 525 ± 50 µS). Az aktiválás

után egy percen keresztül, 10 másodpercenként végeztünk méréseket. Ezen vizsgálat eredményei képezték az *in vitro* vizsgálatok alapját.

A NaF *in vivo* vizsgálata esetében az alkalmazott koncentrációk nem voltak szignifikáns hatással a spermiumok progresszív motilitására ($p=0,7178$). A kontroll csoport $31,25\pm 17,69\%$ progresszív motilitásához hasonlóan, 100 mg/l esetében $22,58\pm 16,52\%$, 200 mg/l esetében $29,08\pm 14,5\%$, 500 mg/l esetében pedig $26,41\pm 12,73\%$ progresszív motilitást tapasztaltunk. Az 5-FU az *in vivo* vizsgálat során szignifikáns hatással volt a sejtek progresszív motilitására ($p=0,0233$), de a hatás nem dóziszfüggő. Az oldószer nem befolyásolta a motilitást. Míg a kontroll csoport átlagos motilitása $32,45\pm 15,51\%$ volt, addig 0,01 $\mu\text{g/l}$ esetében $16,41\pm 9,19\%$, 100 $\mu\text{g/l}$ esetében pedig $18,62\pm 11,96\%$ progresszív motilitást mértünk. Az 1 $\mu\text{g/l}$ koncentráció esetében nem volt szignifikáns a különbség, itt $24,63\pm 18,64\%$ volt az átlagos motilitás. Az aktiváló és immobilizáló oldatok összehasonlítása során megállapítható, hogy tíz másodpercig Hanks-féle sóoldattal immobilizált, valamint desztillált vízzel aktivált minták esetén mérhető a legnagyobb motilitás ($64,34\pm 7,68\%$). Húsz és negyven másodperc között immobilizáló oldat és desztillált víz kombinációjával érhető el a legnagyobb progresszív motilitás ($59,85\pm 24,49\%$, $53,85\pm 16,02\%$, $44,33\pm 18,92\%$), ötven másodperc után pedig a pontyféle immobilizáló és aktiváló oldat alkalmazásával ($36,68\pm 21,55\%$, $34,85\pm 14,36\%$). A NaF *in vitro* vizsgálata során 5 g/l koncentráció esetében 30. perctől kezdve szignifikáns motilitáscsökkenést tapasztaltunk ($p<0,05$): a 0. percben mért $71,81\pm 9,76\%$ progresszív motilitáshoz képest, a 30. percben $58,45\pm 12,35\%$, a 60. percben $42,84\pm 18,79\%$, a 90. percben $33,49\pm 20,58\%$, a 120. percben pedig $29,25\pm 17,75\%$ progresszív motilitást mértünk. Az 5-FU *in vitro* vizsgálata során nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget egyik koncentráció esetében sem a 2 órás expozíció alatt ($p>0,05$).

Vizsgálataink során olyan releváns információkra tettünk szert a nátrium-fluorid és az 5-fluorouracil zebradánio – ezáltal a halak - termékenységét befolyásoló hatásáról, melyről ezidáig nem volt szakirodalmi adat. Az eredmények pontosítása végett további vizsgálatok szükségesek, de ezen kísérletekből is látszik e két fluoridtartalmú vegyület jövőbeni növekvő felhasználásának hosszú távú ökológiai hatása. Ezen kívül fontos lépéseket tettünk a zebradánio sperma toxikológiai célú vizsgálatának optimalizálására, mely a későbbiekben egy egységes halsperma-vizsgálati toxikológiai teszt alapja lehet.