



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**PETESEJT ÁTÜLTETÉS ZEBRADÁNIÓ (*DANIO RERIO*)
HALFAJON
(OOCYTA TRANSZPLANTÁCIÓ HALAKON)**

Doktori értekezés tézisei

Csenki Zsolt Imre

GÖDÖLLŐ

2011

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola
tudományága: Mezőgazdaság-tudomány
alprogram: Halbiológia és halgazdálkodás

vezetője: Dr. Mézes Miklós
egyetemi tanár, az MTA lev. tagja
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Állattudományi Alapok Intézet,
Takarmányozástani Tanszék

témavezető: Dr. Váradi László
egyetemi docens, PhD
SZIE, Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar
Környezet- és Tájgazdálkodási Intézet
Halgazdálkodási Tanszék

társtémavezető: Dr. Müller Ferenc
senior lecturer, PhD
Department of Medical and Molecular Genetics
Division of Reproductive and Child Health
Institute of Biomedical Research
University of Birmingham
Edgbaston, Birmingham, UK

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

.....


.....
A társtémavezető jóváhagyása

1 A MUNKA ELŐZMÉNYEI, KITŰZÖTT CÉLOK

1.1 A munka előzményei

A halak oocytáinak, folliculusainak tanulmányozása hosszú múltra tekint vissza. Az oocyták morfológiai, hisztológiai és biokémiai tulajdonságainak megismerése elengedhetetlen feltétele a gazdaságilag jelentős halfajok hatékony mesterséges szaporításának. Annak ellenére, hogy az oocyták biológiájáról széleskörű információval rendelkezünk, néhány fontos kérdés továbbra is megválaszolatlan:

i) Nem ismert az egyes halfajok folliculus fejlődése során a különböző fejlődési stádiumokba történő átmenetek ideje, amellyel pontosan meghatározhatóak lennének a petesejtek optimális fejlődéséhez szükséges élettani és környezeti feltételek.

ii) Halaknál a spermiumok mélyhűtésére már hosszú ideje jól működő módszerek állnak a rendelkezésünkre, a közeljövőben néhány faj esetében a keltetőházi szaporításkor történő felhasználás széleskörű elterjedése is várható. A folliculusok mélyhűtése szintén megoldott, azonban a mélyhűtött oocyták ikrává érlelésére még nincs kidolgozott módszer, így ezek az ivarsejtek a szaporításra nem alkalmasak.

iii) A fejlődésbiológia kutatásokban, azon belül is az anyai hatással kapcsolatos vizsgálatoknál a hal, mint modellállat, egyre nagyobb szerepet kap. Számos eljárást alkottak már az anyai hatások vizsgálatára, ezek azonban nehezen kivitelezhető nagy technikai felszereltséget igényelő módszerek. Az eddig használt technikák nem tudják közvetlenül az oocytában befolyásolni, illetve vizsgálni az anyai hatást kiváltó faktorokat, ezekhez az oocyta-manipulációk új eljárásainak kifejlesztésére van szükség.

A fent vázolt problémákra a korai fejlődési állapotú folliculusokra kidolgozott transzplantációs és mikromanipulációs eljárás jelentheti a megoldást.

1.2 Célkitűzés

Elsődleges célom volt korai fejlődési stádiumú folliculusok felhasználásával a folliculus transzplantációra alapozott ikraérlelés egy lehetséges módszerének kidolgozása zebraadánió (*Danio rerio*) halfajra. Ezen fő célkitűzésen belül további feladatokat tűztem ki:

- Célom volt a transzplantált folliculusok beépülésének vizsgálata a recipiens petefészkekben.
- További célom volt életképes utód létrehozása átültetett folliculusból.
- Vizsgálni kívántam a szaporítás után a petefészkekben található, eltérő fejlődési stádiumban lévő folliculusok egymáshoz viszonyított arányát az idő függvényében.
- A lehető legpontosabban meg kívántam határozni a különböző folliculus fejlődési állapotok eléréséhez szükséges időket zebraadánió halfajban.
- Választ szerettem volna kapni arra a kérdésre, hogy lehetséges-e mesterségesen irányított fehérjeszintézis, vagy a génmegnyilvánulás manipulációja, a korai fejlődési stádiumú folliculusokban mRNS és DNS bevitellel.

2 ANYAG ÉS MÓDSZER

2.1 Kísérleti állatok tartása

Kísérleteimet zebradánió (*Danio rerio*) halfajon végeztem. A kísérleti állomány tartása külön haltartó szobában, Tecniplast ZebTEC (SZIE, Gödöllő) illetve AquaSchwarz (KIT, Karlsruhe) recirkulációs rendszerben 27,5°C-os vízhőmérsékleten, fényprogram mellett (14 óras megvilágítás, 10 óra sötét) történt. Egy-egy medencében 25 ivarérett egyed került elhelyezésre, ivar szerint szétválogatva.

A kifejlett állatokat naponta kétszer etettem teljes értékű haltáppal, amit hetenként kétszer frissen kelt sórák lárvával egészítettem ki. Az ivadékok az elúszásuk után napi háromszor kaptak haltápot, majd a tizedik naptól naponta kaptak artémia kiegészítést. A halakat páronként szaporítottam (1 ikrás és 1 tejes) 1 literes szaporítóedényekben.

2.2 A kísérletekben használt zebradánió vonalak jellemzése

AB: Vad típusú, rövidúszójú vonal. A transzplantációs kísérletekben az ikrásokat minden esetben recipiensként, a szaporítási kísérletekben a tejeseket keresztezési partnerként használtam.

Gold (gol^{b1}): A zebradánió *gold* mutáns egyedeiben a melanofórák átlagban kisebbek, és halványabbak, illetve átlátszóak, kevesebb melanoszómát tartalmaznak a vad típusú egyedekhez képest (LAMASON et al. 2005). A vonalat a transzplantációs kísérletekben minden esetben recipiensként használtam.

β -actin:YFP: Ezt a transzgenikus zebradánió vonalat (ALAM et al., 1996; HWANG et al., 2003) az KIT, ITG bocsátotta rendelkezésemre és minden esetben donorként használtam a kísérletek során. Az YFP aktivitás elsősorban a vázizomban jelenik meg, de kifejeződik a bőrben valamint a petesejtekben is és mozaikosan más szervekben is.

2.3 Petesejtek átmérőjének meghatározása

A petesejtek átmérőjének meghatározásakor a kiműtött petefészkét 4%-os formalinban fixáltam és okulármikrométer segítségével

meghatároztam a folliculusok átmérőit, vagy az izolált folliculusokról készített fénykép alapján Image J program segítségével mértem a folliculusok átmérőjét (Research Services Branch, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD., USA).

2.4 Oocyták gyűjtése

Az ivarérett donor anyákat (β -*actin:yfp*) MESAB oldattal túlaltattam, majd a kiműtött petefészkeket néhány percre mPBS oldatot tartalmazó Petri-csészébe helyeztem és addig szuszpendáltam, amíg a folliculusok elkülönültek egymástól. Okulármikrométerrel felszerelt sztereómikroszkóp alatt válogattam össze azokat a folliculusokat, amelyek átmérője 50 és 150 μ m között volt. A megfelelő folliculusokat Holtfretter vagy Zebrafish Ringer oldatba helyeztem a transzplantálásig, illetve a mikroinjektálásig.

2.5 A recipiens anyák előkészítése és a folliculusok transzplantációja

A recipiens (AB, vagy *gold*) anyákat a kísérlet napján szaporítottam. A szaporítás után az anyákat MESAB oldattal elaltattam, majd Holtfretter vagy Zebrafish Ringer oldattal kétszer kimostam a petefészkeket. A transzplantáció előtt az ivarnyílás környékét 70%-os etil-alkohollal fertőtlenítettem.

A transzplantációhoz speciálisan módosított pipettahegyet használtam. A folliculusokat automata pipetta segítségével a preparált pipettahegybe szívtam, majd az ivarnyíláson keresztül kapillárist óvatosan az anyák petefészkebe vezettem és 25-30 μ l oldattal 25-100 folliculust juttattam az anyák petefészkebe.

2.6 In situ hibridizációs vizsgálatok

Az *in situ* hibridizációs vizsgálatokat a HAUPTMANN (1999) által leírt standard protokoll szerint végeztem, a permeabilizációs lépés kihagyásával.

2.7 Mikroszatellit analízis

A feltételezhetően transzplantált folliculusból származó nem táplálkozó lárvákból, illetve a féltestvéreikből a teljes egyedeket, a donor és a recipiens anyából, valamint a szaporításnál használt tejesből vett úszómintát -20°C -on, 96%-os etanolban tároltam a felhasználásig.

A DNS-t fenol-kloroformos eljárással izoláltam (SAMBROOK et al. 1989). Az izolált DNS koncentrációját és tisztaságát meghatároztam (NanoPhotometer, IMPLEN, Germany), a DNS koncentrációját $10\text{ng}/\mu\text{l}$ -re állítottam be.

Az analízishez kromoszómánként két (karonként egy) mikrosatellitot választottam ki (összesen 50db) az Ensembl genom adatbázisból (http://www.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index), amelyeket a szülő generációból származó egyedeken teszteltem. A szülők elkülönítésére alkalmas mintázatot mutató mikrosatellitekkel vizsgáltam a feltételezhetően transzplantált oocytából származó egyedeket és féltestvéreiket.

2.8 Az oocyta injektálásnál használt konstrukciók előállítása és az injektálás menete

A mikroinjektálás során *DsRed* mRNS-t, *p β -actin:LacZ* és *pCMV:GFP* konstrukciókat juttattam *β -actin:YFP* és AB anyáktól származó oocytákba. A *DsRed* mRNS-t pCS2+ *DsRed* plazmidről Message Machine mRNS kit (Ambion, TX, USA) segítségével készült, $5\ \mu\text{l}$ 10%-os fenolvörös hozzáadásával $10\ \mu\text{l}$ végső mennyiségben a kitben szereplő protokoll alapján. A *p β -aktin:LacZ* és a *pCMV:GFP* génkonstrukciókat tartalmazó kész injektáló-oldatokat Müller Ferenc (KIT, ITG) bocsátotta rendelkezésemre.

Petri-csészékbe öntött 2%-os agaróz gélbe egy szike segítségével 2 mm mély árkokat metszettem, amelyekben az injektálás során a folliculusok helyzetét rögzítettem. A Petri-csészét zebrafish Ringer oldattal töltöttem fel. Az injektálás mikroinjektor (Tritech Research, USA) és előre gyártott üvegapilláris (Cat# 5242 952.008, Eppendorf Germany) segítségével, sztereómikroszkóp alatt, szabad kézzel történt. Egy oocytába 1-2 nl injektáló oldat került.

2.9 Alkalmazott statisztikai módszerek

A vizsgálatok eredményeit SPSS 13.0 for Windows programmal értékeltem ki. A petefejlődés dinamikájának vizsgálatokor ANOVA, ($P < 0,05$), a Test of Homogeny eredményétől függően Tukey, illetve Dunnet's tesztet alkalmaztam. A folliculusok beépülésének vizsgálatokor ($P \leq 0,05$) Kruskal-Wallis tesztel elemeztem az eredményeket.

2.10 Saját vizsgálatok

2.10.1 A petesejtfejlődés dinamikájának vizsgálata

A kísérlet során 50 AB anyát vizsgáltam 10-es csoportokban. A szaporítás után közvetlenül, és a következő négy hétben hetenként egy-egy csoport egyedeit túlaltattam. A halak testtömegét és a kiműtött petefészkek tömegét lemértem. A 4%-os formalin oldatban fixált petefészkekben okulármikrométer segítségével meghatároztam a petesejtek átmérőjét, majd ebből az egyes fejlődési stádiumok arányát a petefészkekben. A testtömegből és a petefészektömegekből GSI% értéket számoltam.

2.10.2 Transzplantált folliculusok kimutatása és beépülésének vizsgálata a recipiens petefészkekből

A kísérletek során 5 AB és 5 gold anya petefészkebe transzplantáltam 20-25 transzgenikus folliculust.

A recipiens AB anyák petefészket a beültetést követő negyedik napon, a halak túlaltatása után kiműtöttem, majd normál, illetve fluoreszcens mikroszkóp alatt felvételeket készítettem róluk. A petefészkeket BT-Fix-ben fixáltam, majd a fixált szövetben *in situ* hibridizációval (ISH) mutattam ki a transzgenikus folliculusokat.

A recipiens *gold* ikrásokat a beültetést követő második napon elaltattam, majd a beültetett folliculusokról, az állatok felvágása nélkül, a hasfalon keresztül készítettem normál megvilágítású és fluoreszcens képeket.

2.10.3 A follikulus-beépülés hatékonyságának vizsgálata

A kísérlet során 100 AB anya petefészkebe egyedenként 20-40 transzgenikus follikulust ültettem be. A beültetést követő első hét minden napján, illetve a 14. napon vizsgáltam fluoreszcens mikroszkóp alatt a kiműtött petefészkekben található transzgenikus follikulusok számát.

2.10.4 Transzplantált follikulusok növekedésének kimutatása a recipiens petefészkekből

20 recipiens anyába egy alkalommal átlagosan 50 db I-es stádiumú follikulust transzplantáltam. A manipulált petefészkeket 1-2 héttel a transzplantáció után fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam, a transzgenikus follikulusokat izoláltam. A follikulusok méretét a transzplantálás előtt és után Image J program segítségével határoztam meg.

2.10.5 Szaporítási kísérletek

A kísérlet során 100 AB anya petefészkebe egyedenként átlagosan 100 transzgenikus follikulust ültettem be, majd 6 héten keresztül hetenként szaporítottam őket. A lerakott ikrákat a termékenyülést követő 24. és 48. órában fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam, a feltehetően transzgenikus oocytából származó ivadékokat tíz napos korban normál és fluoreszcens megvilágításban vizsgáltam. Az egyedekből mintát vettem a későbbi mikroszatellit analízishez.

2.10.6 Oocyta mikromanipuláció

Az mRNA injektálásához transzgenikus, a DNS konstrukciók injektálásához AB anyák petefészkekből gyűjtöttem I. és II. stádiumú follikulusokat. A *DsRed*mRNS-sel injektált oocytákat tartalmazó follikulusokat AB anyákba ültettem, és 24 órás inkubációs idő után a petefészkeket kiműtöttem. A *pβ-actin:LacZ* és *pCMV:GFP*-vel injektált oocytákat 24 órán keresztül 27,5 °C-on inkubáltam. A follikulusokat fluoreszcens mikroszkóp alatt vizsgáltam.

3 EREDMÉNYEK

3.1 A petesejtfejlődés-dinamika vizsgálatának eredményei

A GSI értéke közvetlenül a szaporítás után (0. hét) volt a legkisebb (6,8%), majd a második hétre, a kiindulási értékhez képest közel háromszorosára növekedett (18,4%). Statisztikailag igazolható különbséget ($P < 0,05$) csak az első három mintavétel alkalmával számított GSI értékek között sikerült kimutatni.

A különböző fejlettségű folliculusok gyakoriságának meghatározásánál, a formalinos fixálás miatt, a különböző stádiumokba történő besorolást kizárólag a Selman-féle méreetskála szerint végeztem (SELMAN et al. 1993).

Az elsődleges növekedés fázisában (I. stádium) lévő folliculusok csoportjába a maximum 140 μm átmérőjű folliculusokat soroltam, amelyek százalékos aránya a kísérlet során végig nagyon magas (kb. 60%) volt. A szaporítástól a második hétig a számuk enyhén emelkedett, majd a negyedik hét végére a szaporítás után mért érték alá csökkent. Statisztikailag igazolható különbséget nem sikerült kimutatni az egyes hetek eredményei között ($P < 0,05$).

A kortikális alveolus stádiumban lévő folliculusok csoportjába a 140-340 μm átmérőjű folliculusokat soroltam, amelyek részaránya 20-25% körül mozgott a vizsgálati idő alatt, legnagyobb mennyiségben (26,37%) közvetlenül a szaporítás után fordultak elő. Statisztikailag igazolható különbséget nem sikerült kimutatni az egyes mintavételi időpontok értékei között ($P < 0,05$).

A vitellogenezis stádiumában lévő folliculusok csoportjához a 340-690 μm átmérőjű folliculusokat soroltam. Annak ellenére, hogy ez a legnagyobb mérettartományú csoport, a petefészekben a részaránya az összes folliculushoz képest csak 10% körül mozgott. Statisztikailag igazolható különbséget csak a második és negyedik héten vizsgált minták között tudtam kimutatni ($P < 0,05$).

A IV (maturáció) stádiumában lévő folliculusokhoz soroltam az összes 690-730 μm közötti folliculust, amelyek részaránya a legkisebb a petefészekben az összes folliculushoz mérten (kevesebb, mint 1,5%). A IV. stádiumú folliculusok száma közvetlenül a szaporítás után volt a legkevesebb (0,3%), ez statisztikailag igazolhatóan eltért, a negyedik hét

kivételével, a többi mintavételkor mért eredménytől. A második héttől statisztikailag igazolható különbséget nem sikerült kimutatni ($P < 0,05$).

Az V. stádiumú (érett ikra) csoportba soroltam az összes 730 μm -nél nagyobb folliculust függetlenül attól, hogy valóban ovulált ikraszemként volt-e jelen a petefészkekben. A csoport aránya folyamatosan növekedett az idő előrehaladtával. Közvetlenül az ívás után, mivel az ikrák kiürültek a petefészkekből, szinte nem is fordultak elő kimutatható mennyiségben (0,12%). A negyedik hét végére a számuk elérte az 5,7%-ot, ennek egy része valószínűleg atretizálódott ikraszem volt. A szaporítás utáni és a negyedik heti előfordulások statisztikailag igazolhatóan különböztek az elsőtől a harmadik hétig vizsgált időpontok értékeitől ($P < 0,05$).

3.2 Transzplantált folliculusok kimutatása és beépülése, eredmények

A kísérlet első részében normál megvilágítás mellett a vizsgált petefészkek között nem volt megfigyelhető különbség. Fluoreszcens fényben a transzgenikus petefészkekben az összes folliculus, a recipiens petefészkekben pedig csak néhány, a transzplantáció során bejuttatott donor folliculus mutatta a markergén aktivitást. A transzgén mRNS-ének jelenléte is kimutatható volt mind a pozitív kontroll transzgenikus petefészkekben, mind a recipiens petefészkek donor folliculusaiban *in situ* hibridizáció segítségével.

A kísérlet második részében a beültetett folliculusok *in vivo* kimutatásának lehetőségét vizsgáltam melanofóra mutáns (*gold*) anyákon. A donor petesejtek egy részének fluoreszcens izzását a *gold* anyák petefészkeiben is sikerült megfigyelni az állatok hasfalán keresztül.

3.3 Eredmények a folliculus-beépülés hatékonyságáról

A recipiens petefészkekben megtalálható donor folliculusok száma a transzplantáció utáni első napon átlagosan közel a felére esett vissza a kiindulási mennyiséghez képest ($47,5 \pm 20,5\%$). A csökkenés a kísérlet első hetének végéig folytatódott, a mértéke az egyes napokon, a negyedik és ötödik nap kivételével, statisztikailag is igazolható volt ($P \leq 0,05$), ugyanakkor túlélő, beépült folliculusokat a második hét végén is találtam a recipiens anyák petefészkeiben ($2,6 \pm 2,6\%$).

3.4 Transzplantált folliculusok növekedésének kimutatása, eredmények

A beültetés után a donor folliculusok száma, az előző kísérletnél tapasztaltakhoz hasonlóan jelentősen csökkent, azonban minden vizsgálati időpontban találtam beépült, túlélő petesejteket. A petesejtek egy része nem fejlődött tovább, néhány folliculus mérete azonban meghaladta a beültetés előtt mért legnagyobb folliculus átmérőjét, ezek közül háromnál statisztikailag is sikerült igazolni a növekedést ($P \leq 0,05$). A három legnagyobb donor folliculus közül egy az első hét végére elérte a Selman-féle méretskála szerinti III. stádiumot (486 μ m), egy pedig a második hét végére megközelítette a IV. fejlődési stádium mérethatárát (680 μ m).

A donor folliculusokról készült képek alapján a beépült és az oogenezisbe újra bekapcsolódó, továbbfejlődő folliculusok épnek, normál fejlődésűnek tűntek. A recipiens petefészekben csak a donor transzgenikus folliculusok izzotak a fluoreszcens megvilágításban, a kontroll folliculusokról készült felvételekhez hasonlóan. Megfigyelhető volt továbbá, hogy a fejlettebb folliculusok gyengébb fényel izzotak, mint a fiatalabb fejlődési stádiumban lévők.

3.5 A szaporítási kísérletek eredményei

Az ellenőrzések során összesen négy YFP aktivitást mutató embriót találtam, amelyek két különböző recipiens anyától származtak. Az egyik recipiens anya utódai között két transzgenikus egyedet találtam a transzplantációt követő harmadik héten. A másik anya utódai közül szintén kettő mutatta a transzgén jelenlétét, viszont itt egy embrió a harmadik, egy a negyedik szaporításból származott. A transzplantált folliculusból származó ivadék a kontrollként használt transzgenikus ivadékhöz hasonlóan sárgás-zöld fényben izzott fluoreszcens megvilágításban, azokon a területeken, amelyeken a transzgén megnyilvánult. Hasonló izzás a recipiens anya saját folliculusaiból származó utódjánál nem volt megfigyelhető. Az összes donor folliculusból származó ivadék a korának megfelelő, normál fejlődést mutatott a vizsgálati idő alatt. A négy utódból hármat DNS vizsgálatokhoz használtam fel, egy egyedet pedig felneveltem. A felnevelt ivadék nőivarú volt, ivarérese után szaporítottam, utódai normál fejlődést mutattak.

A kiválasztott mikroszatellitok közül 8 marker volt alkalmas a kísérletben résztvevő szülők elkülönítésére és nyújtott megbízható információt az utódok származását illetően. A mikroszatellit vizsgálat eredménye egyértelműen bizonyítja, hogy a transzgenikus ivadékok a donor anya és a szaporításnál használt tejes utódja, biztosan nem a recipiens anyától származnak.

3.6 Az oocyta mikromanipuláció eredményei

A kísérlet első részében *in vitro* szintetizált *DsRedmRNS*-t injektáltam. Az injektált folliculusok közül azok, amelyekben az mRNS-ről termelődött az RFP fehérje pirosan is izzottak a fluoreszcens mikroszkóp alatt. Normál megvilágításban mind az injektált, mind a kontrollként használt folliculusok épek, a fejlettségi állapotuknak megfelelően néztek ki.

A 477 injektált oocytát tartalmazó folliculusból 58-at sikerült izolálni a recipiens petefészkekből az inkubáció után, melyekből 6 (10,3%) mutatta egyszerre a kétféle markert. A hatékonyság szempontjából az ötödik sorozat bizonyult a legjobbnak, ahol a visszanyert folliculusok 21,4%-ában működött a bejuttatott konstrukció.

A kísérlet második részében DNS konstrukciók injektálására került sor. A GFP-t tartalmazó konstrukcióval injektált folliculusok közül 4 (6,7%) világított fluoreszcens fényben. A nem injektált, és a *lacZ*-t tartalmazó konstrukcióval injektált folliculusok nem mutattak GFP aktivitást. Normál megvilágításban mind az injektált, mind a kontrollként használt folliculusok épek, a fejlettségi állapotuknak megfelelően néztek ki.

3.7 ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Zebradánió halfajon a világon elsőként dolgoztam ki a korai fejlődési stádiumú (I-II. stádium) folliculusok transzplantációjának egy módszerét. A kísérleteim során egyértelműen bizonyítottam, hogy a donor folliculusok beépülnek és túlélnek a recipiens petefészkekben, visszakapcsolódnak az oogenezis folyamatába és belőlük érett ikra, majd életképes utód fejlődhet.
2. A transzplantációs módszer segítségével elsőként sikerült meghatároznom a zebradánió folliculusainak az egyes fejlődési

stádiumok eléréséhez szükséges időpontokat 27.5°C-os tartási hőmérséklet mellett.

3. Sikerült igazolnom, hogy a zebradánió petefészkében az első négy fejlődési állapot bármelyikében hosszabb-rövidebb nyugalmi időszakot tölthetnek el a folliculusok és onnan bármikor visszakapcsolódhatnak az oogenezis folyamatába.
4. Munkám során meghatároztam a zebradánió petefészkében a folliculusok egymáshoz viszonyított arányát közvetlenül a szaporítás után, majd az azt követő négy hétben.
5. Elsőként sikerült bizonyítanom, hogy van lehetőség mRNS és DNS konstrukciók injektálásával befolyásolni a fiatal fejlődési állapotú folliculusok génmegnyilvánulását zebradánióban.

4 KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

4.1 A petesejtfejlődés dinamikájának vizsgálatából levonható következtetések

Az eredmények alapján elmondható, hogy a zebraadánióban több más trópusi halfajhoz hasonlóan az oogenezis folyamatos és gyors (SZABÓ 2000b). Az I. és II. stádiumú folliculusok részaránya a petefészken belül végig magas marad, azonban közöttük a mérsékeltövi hideg- és melegvízi halfajoknál tapasztalható korai fejlődési stádiumokra jellemző trendet nem lehet megfigyelni (LEFLER et al. 2008).

Laboratóriumi körülmények között, hetenként egyszeri szaporítással átlagosan 100-150 ikraszem nyerhető egy-egy zebraadánió ikrástól. Ennél a mennyiségnél az ivarérett zebraadánió petefészkeiben nagyságrendekkel több folliculus található egyszerre. A nagy mennyiségű folliculus a petefészkekben arra enged következtetni, hogy a folliculusok egy része, fejlődési stádiumtól függetlenül, nyugalmi állapotban található a petefészkekben. Arra azonban, hogy a sokszor több száz hasonló fejlődési állapotú folliculus közül melyik és mi alapján kezd továbbfejlődni, a szakirodalomban nincs fellelhető adat. A folyamat mélyebb megismerése jelentőséggel bírhat a gazdaságilag jelentős halfajok szaporításánál, nagyobb mennyiségű ikratételek nyérése érdekében.

A természetben élő zebraadánióknál az ívások zöme egy jól elkülöníthető szaporodási időszakban (esős évszak), előre nem meghatározott időközönként történik, ezt egy az ívás szempontjából kevésbé aktív szakasz követi (száraz évszak) (MUNRO 1990). Ennél fogva a petefejlődés dinamikájának vizsgálatakor kapott eredmények valószínűleg csak a laboratóriumi körülmények között élő zebraadániókra, azon belül is csak az AB vonal egyedeire érvényesek, ahol a sok generációs labortartás során feltehetően szelekciós nyomás érvényesült a kedvező szaporodásbiológiai tulajdonságokra.

A petesejtfejlődés dinamikájának vizsgálatából kapott eredmények alapján összességében elmondható, hogy az ivarérett ikrásoktól bármikor lehet nagyobb mennyiségű I. stádiumú folliculust nyerni, arra a kérdésre azonban, hogy az egyes fejlődési állapotból a következőbe mennyi idő alatt lép a folliculus, ez a kísérlet nem ad választ.

4.2 Transzplantált follikulusok kimutatásából és beépülésének vizsgálatából levonható következtetések

A donor follikulusok életképességének bizonyítására *in situ* hibridizációs vizsgálatokat végeztem. Az *in situ* hibridizációs vizsgálatok eredményei alapján valószínűsíthető, hogy a transzplantáció után a donor follikulusok egy része beépül, és életben is marad a recipiens petefészekben.

A zebradánió *gold* mutáns változat alkalmas lehet az *in vivo* vizsgálatokra. A beültetett follikulusok életképességére, illetve méretére a hasfalán át történő vizsgálat alapján azonban nem lehet következtetni.

4.3 A beépülés hatékonyságának vizsgálatából levonható következtetések

A kísérlet eredményei alapján elmondható, hogy az első hét végén a petefészekben található beültetett follikulusok már beépültek tekinthetők és jó eséllyel folytathatják az oogenezist.

A nagymértékű és hirtelen csökkenésnek több oka lehet. A legvalószínűbb, hogy az általam használt izolálási módszer nem volt optimális, a szuszpendálás során a follikulusok sérülhettek, az életképességük erősen csökkenhetett.

A kísérletben donorként használt transzgenikus vonalat ugyanabból a vonalból (AB) alakították ki, amelyet recipiensként használtam, így a két vonal genetikai szempontból homogénnek tekinthető, a kilökődési reakció esélye minimális. A vizsgált petefészekben nem figyeltem meg akut vagy krónikus kilökődési folyamatokra utaló tüneteket (GERGELY és ERDEI 2000). A donor follikulusok túlélését, az esetleges kilökődési reakciók lassítását az optimális tartási körülmények is elősegíthették (BLY és CLEM 1992, NEVID és MEYER 1993). Véleményem szerint így a follikulusok számának csökkenésénél a kilökődési reakciók nem játszottak lényeges szerepet, bár a kilökődési folyamatokat direkt módszerekkel nem vizsgáltam.

4.4 A donor folliculusok növekedésének vizsgálatából levonható következtetések

A kísérlet segítségével sikerült bepillantást nyernem a zebra-dánió folliculus fejlődésének dinamikájába. Az eredmények segítségével meghatározhatóak voltak azok az időintervallumok, amelyek alatt a folliculusok az egyes fejlődési stádiumokból a következőkbe léphetnek. Az I-es stádiumú folliculusok egy hét alatt képesek III. stádiumú folliculussá, a következő hét végére IV. stádiumú folliculussá fejlődni. Az érett ikrává történő fejlődéshez szükséges időt ezzel a kísérlettel még nem sikerült meghatároznom.

A donor folliculusok egy része nem növekedett a recipiens petefészekben, illetve mindkét vizsgálati időpontban találtam azonos fejlődési állapotú, a kiindulási mérethez képest növekedett folliculusokat. Ezáltal részben sikerült alátámasztanom azt a korábbi felvetésemet is, hogy az oogenezis során a folliculusok bármely fejlődési szakaszban képesek hosszabb- rövidebb nyugalmi időt eltölteni.

4.5 A szaporítási kísérletekből levonható következtetések

A kísérlet alapján elmondható, hogy a fajon belüli folliculus transzplantáció sikeresen végrehajtható, az általam kifejlesztett módszer alkalmas a fiatal fejlődési stádiumú folliculusok recipiens petefészekbe történő beültetésére.

Sikerült bizonyítanom, hogy a beültetett folliculusokból érett ikrá fejlődik, amiből a termékenyülés után életképes lárva kel ki, amely megfelelő tartási körülmények között fertilis felnőtt egyedé válik. Ezek alapján elmondható, hogy a transzplantáció semmilyen káros változást nem okoz a donor folliculusból származó egyedek szervezetében.

4.6 Az oocyták mikroinjektálásából levonható következtetések

A kísérlet első részében mRNS-t injektáltam *β -actin:YFP* oocyták citoplazmájába. Az eredmények alapján elmondható, hogy az oocyták sikeresen manipulálhatóak mRNS-sel történő mikroinjektálással, az egy napos inkubáció elegendő az mRNS-ről történő fehérje szintézisére. A mikroinjektálás hatékonysága azonban igen alacsony. Megállapítható továbbá, hogy az injektált folliculusok beépülésének hatékonysága jóval elmaradt a korábbi kísérletek eredményeitől, mivel az injektálás, nagy

valószínűséggel a kapilláris okozta mechanikai sérülés miatt, csökkenti a folliculusok életképességét.

A kísérlet második részében DNS konstrukciókat injektáltam vad típusú anyáktól származó folliculusokba. Az eredmények alapján itt is elmondható, hogy az egy napos *in vitro* inkubáció elegendő volt a riporter génről származó fehérje szintézisére. A *lacZ* riporterfehérje kimutatására a fluoreszcens vizsgálat közvetlenül nem alkalmas, ezzel egyértelműen sikerült bizonyítani azt is, hogy a fluoreszcens izzás nem az injektálásnak, mint eljárásnak vagy az injektáló oldat valamely összetevőjének a következménye.

Összességében megállapítható, hogy a fiatal fejlődési állapotú folliculusok genetikai anyaga közvetlenül manipulálható nukleinsavakkal történő mikroinjektálással, amely a kifejlesztett transzplantációs eljárással együtt alkalmazva új módszert jelenthet a fejlődésbiológiai és más, folliculuson alapuló kutatásokban.

4.7 A két módszer eredményeinek összegzése alapján levonható következtetések

A transzplantációs technika számos előnnyel rendelkezik az eddigi anyai hatást vizsgáló vagy manipuláló eljárásokkal szemben. A ma használt módszerek esetén az anyai gének manipulálása csak anyai mutánsok létrehozásával lehetséges PGC transzplantációval (TAKEUCHI et al. 2003), zigotikus mutáns szomatikus „kimentésével” vagy anyai mutációk négy generációs vizsgálatával (DRIEVER et al. 1996), amelyekhez mindig szükség van a zigotikus mutáns meglétére. Az újonnan kifejlesztett folliculus transzplantációs technikánál azonban lehetőség nyílik a vad típusú oocyta direkt manipulálására reverz genetikai módszerekkel és nincs szükség zigotikus mutánsokra a funkcióvesztéses (loss-of-function) fenotípushoz. Ilyen manipulációs lehetőségek pl. a gént „csendesítő”(gene knock down) módszerek (mint az RNS interferencia, a domináns negatív fehérje variáns túltermeltetése, vagy a MO technikák). A jövőben szükség lehet a folliculusokra alapozott knock-down technikák kidolgozására.

Nyilvánvaló, hogy az oocyta transzplantációnak a négygenerációs anyai mutáns vonalak előállításával szemben számos előnye van. Az előbbi klasszikus genetikai megközelítésen alapuló módszer csak olyan anyai hatású gének azonosítását teszi lehetővé, amelyek oocyta specifikusak, és nem rendelkeznek alapvető szomatikus funkciókkal. A reverz genetikai megközelítések ezzel szemben bármely, az oocytában

aktív gén azonosítását és oocyta specifikus funkciójának tanulmányozását lehetővé teszik.

A reverz genetikai megközelítések valójában nem szolgáltatnak kellő elméleti alapot ahhoz, hogy az oocyta fejlődés során kifejeződő gének funkcióját megállapíthassuk. Így azok a technikák, amik lehetővé teszik, hogy a manipulált oocyta embrióvá fejlődjön, különösen informatívak lehetnek számos embriogenezis során lezajló folyamat nyomkövetésénél a megtermékenyítéstől az anyaiból a zigóta irányította embriogenezisbe történő átalakuláson át a szövet és sejt specifikációig (elköteleződésig) és differenciálódásig. A késői fejlődési stádiumú oocyták *in vitro* érlelésénél történt jelentős előrelépés (SEKI et al., 2008), de az anyai hatás kialakításban szerepet játszó géntermékek hatékony manipulálásához korai fejlődési stádiumú oocytákra van szükség, amelyeket eddig nem tudtak sikeresen *in vitro* inkubálni. Az új transzplantációs technika optimalizálást követően megfelelően kiegészítheti az anyai hatású gének tanulmányozása során alkalmazott klasszikus genetikai megközelítéseket.

Ezen felül az oocyta transzplantáció hatékony knock down technikákkal kombinálva azt is lehetővé teszi, hogy meghatározzuk, hogy a zigótában aktív, anyai hatású gének mRNS –ei vagy fehérjéi milyen szinten játszanak szerepet az egyedfejlődésben (embriogenezisben). Azon kevés gén esetében, amelyeknél zigotikus és anyai mutánsok is elérhetőek (pl. *one eyed pinhead* vagy *dicer*) az anyai hatású gén funkcióvesztése a zigotikus mutáns egyébként meglehetősen gyenge fenotípusát drasztikusan felerősítette (GIRALDEZ et al. 2006; GRITSMAN et al. 1999). Egy nemrég készült tanulmány szerint a hólyagcsíra és a szedercsíra állapotban kifejeződő gének kb. 20%-a már anyai eredetű géntermékként jelen van (MATHAVAN et al. 2005). Ez alapján a zigótában kifejeződő gének ezrei már anyai mRNS-ként is jelen vannak, így a zigotikus mutánsok fenotípusa valószínűleg jelentősen felerősíthető az anyai hatás gátlásával a korai embriogenezis alatt. Az oocyta manipuláció jó eszköz lehet ennek igazolásához.

4.8 Javaslatok

4.8.1 Javaslatok a follikulus transzplantáció témakörében

- Annak ellenére, hogy a follikulus transzplantáció egy működő technika, a határfok növelése a későbbiekben szükséges lesz a módszer széleskörű elterjedéséhez. A transzplantációhoz szükséges eszközök és a follikulus izolálási módszer fejlesztésével, változtatásával már elfogadható hatékonyságúvá válhat az eljárás, ezért a későbbiekben javaslom ezeknek a fejlesztéseknek az elvégzését.
- A follikulusok petefészken belüli fennmaradásának vizsgálatát a későbbiekben, lehetőség szerint, felnőtt korban is félig, vagy teljesen átlátszó zebradánió vonalakon kellene vizsgálni. A transzplantált transzgen markerrel jelölt follikulusok sorsa így könnyen, a teljes vizsgálati időszak alatt nyomon követhető lenne a recipiens petefészkekben, ezáltal még több új információt nyerhetnénk a halak oogenezisével kapcsolatban. Javaslom ezért a későbbiekben a félig átlátszó vonalak közül a *gold* vagy a *nacre*, a felnőtt korban is transzparens vonalak közül a *casper* (WHITE et al. 2008) vonal használatát a transzplantációs vizsgálatokhoz.
- Javaslom továbbá interspecifikus, illetve mélyhűtött, majd felolvasztott follikulusokkal is transzplantációs kísérletek elvégzését is.

4.8.2 Javaslatok az oocyta mikromanipuláció témakörében

- Az oocyták mikroinjektálással történő manipulációs módszerének a tökéletesítésére is szükség van. Az eljárás tovább fejleszthető például a célzott sejtmagba történő injektálással, az injektálás körülményeinek optimalizálásával, precíziós mikromanipulátor használatával és az oocyták helyzetének megtartásával/helyhez rögzítésével (immobilizálás) az injektálás folyamán.
- Ezek alapján javaslom a továbbiakban az oocyták morpholino-val, illetve siRNS-sel történő injektálásával kapcsolatos kísérletek tervezését, elvégzését.

Az értekezés témakörében megjelent közlemények

Tudományos közlemények folyóiratban:

- CSENKI ZS., ZAUCKER, A., KOVÁCS B., HADZHIEV, Y., HEGYI Á., LEFLER K.K., MÜLLER T., KOVÁCS R., URBÁNYI B., VÁRADI L., MÜLLER F.** (2010): Intraovarian transplantation of stage I-II follicles results in viable zebrafish embryos, *The International Journal of Development Biology* 54: 585-589 [IF:2,161*]
- KOVÁCS R., URBÁNYI B., KOVÁCS B., BENCSIK D., STASZNY Á.,HEGYI Á., CSENKI ZS.** (2009) A zebraadánió (*Danio rerio*) mint a toxikológiai vizsgálatok modellállata. AWETH Vol 5. 4. 446-447.
- MÉSZÁROS E., HEGYI Á., CSENKI ZS., KOVÁCS R., LEFLER K. K., DANKÓ I., URBÁNYI B.** (2009) Az ikrakeltetés során alkalmazott malachitöld egyéb károsító hatásai, valamint alternatív helyettesítési lehetősége a haltenyésztésben AWETH Vol 5. 4. 448-454.

Konferencia kiadványban megjelent közlemények:

- STASZNY Á., HAVAS E., URBÁNYI B., MÜLLER T., CSENKI ZS.** (2010) Pikkely- morfológiai vizsgálatok zebraadánió (*Danio rerio*) halfajon. TUDOC 2010. Konferencia Kiadvány. ISBN 978-963-269-2. 197-206.
- CSENKI ZS., ZAUCKER A., KOVÁCS B., HADZHIEV Y., HEGYI Á., LEFLER K.K., MÜLLER T., KOVÁCS R., URBÁNYI B., VÁRADI L., MÜLLER F.** (2009) Intraovarian transplantation of stage I-II follicles results in viable zebrafish embryos, 6th European Zebrafish Genetics and Development Meeting Rome, Italy, Book of Abstracts 148. p
- CSENKI ZS** (2008): Point of view of a zebrafish Facility manager, Tecniplast 3rd Aquatic Specialist course Milano, Italy, Book of Abstracts: 4.p
- CSENKI ZS., ZAUCKER A., KOVÁCS B., LEFLER K. K. , HEGYI Á., MÜLLER T., KOVÁCS R., HADZHIEV Y., URBÁNYI B., MÜLLER F., VÁRADI L.** (2008): Oocytá transzplantáció, és mikromanipuláció zebraadánió (*Danio rerio*) oocytákon. XXXII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 32-33.
- CSENKI ZS.** (2007): Breeding, housing and research of Zebrafish in Tecniplast system. 1st Tecniplast Central Europe Scientific LAS Conference, Gödöllő, Book of Abstracts: 16.p.
- CSENKI ZS., ZAUCKER A., HADZHIEV Y., HEGYI Á., URBÁNYI B., MÜLLER F., VÁRADI L.** (2007) Oocyták fejlődésének vizsgálata az oocytá transzplantáció után zebraadánió (*Danio rerio*) halfajon XXXI. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 16.
- CSENKI ZS., ZAUCKER A., HADZHIEV Y., HEGYI Á., FICSURA A., URBÁNYI B., MÜLLER F., VÁRADI L.**(2006) Petefészekvizsgálatok

oocyta transzplantáció után zebradánió (*Danio rerio*) halfajon XXX. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, : 55.

CSENKI ZS., ZAUCKER A., HADZHIEV Y., HEGYI Á., URBÁNYI B., VÁRADI L., MÜLLER F. (2006) Oocyte transplantation in zebrafish (*Danio rerio*) Aqua 2006 conference 2006. 05. 09 – 2006. 05. 13., Firenze, Abstracts book 201.

CSENKI ZS., ZAUCKER A., HADZHIEV Y., HEGYI Á., VÁRADI L., MÜLLER F. (2006): Oocyte transplantation in fish, Aquaculture America 2006, Book of Abstracts: 72. p.

CSENKI ZS., HEGYI Á., VÁRADI L. (2005): Oocyta transzplantáció zebradánió halfajon, XXIX. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 34-35.

Az értekezés témaköréhez nem kapcsolódó publikációk

Tudományos közlemények referált folyóiratban:

HEGYI Á., LEFLER K.K., MÉSZÁROS E., DANKÓ K., CSENKI ZS., URBÁNYI B. (2009) Examination of stress appearing in the process of propagation on four economically important fish species Hungarian Agriculture Research 1: 15-18.

HEGYI Á., LEFLER K. K., CSENKI ZS., MÉSZÁROS E., GÁL J. (2009): Tógazdaságokban előforduló halfajok plazma fruktózamin koncentrációjának meghatározása. Magyar Állatorvosok Lapja, 131 (6): 353-356.

BENCSIK D., BASKA F., CSENKI ZS., URBÁNYI B., SZABÓ T. (2009) A fokhagymakivonat felhasználásának lehetőségei a haltenyésztésben Halászatfejlesztés 32, HAKI Szarvas 87-95p.

VÁRADI L., BÚZA E., CSENKI ZS., MÜLLER T., MÉZES M. (2009) Ismétlődő stressz hatásainak vizsgálata halakon AWETH Vol 5. 4. 474-479.

KOVÁCS B., CSENKI ZS., HOITSY GY., VÁRADI L. (2006): Különböző karotinoid kiegészítések komplex hatása néhány gazdaságilag fontos halfajra (szívárványos pisztráng, koiponty, ponty, ezüstkárász) Halászat 99: 119-124

Magyar nyelvű könyvrészlet:

VÁRADI L., CSENKI ZS. (2005) Egyéb halgazdálkodási tevékenységek, In. Horgászvizek kézikönyve (szerkesztő: Dr. Váradi László és Füstös Gábor) 203-222.

HEGYI Á., **CSENKI ZS.** (2004): A tavak karbantartása és műszaki felszereltsége In. Kerti tavak kézikönyve (szerkesztő: Dr. Váradi László) 197-211.

Konferencia kiadványban, összefoglalóként megjelent közlemények:

- STASZNY Á., HAVAS E., KOVÁCS R., URBÁNYI B., PAULOVITS G., BENCSIK D., MÜLLER T., **CSENKI ZS.** (2010) Alakvizsgálatok zebra-dánió (*Danio rerio*) pikkelyen XXXIV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, : 37.
- KOVÁCS R., **CSENKI ZS.**, GAZSI GY., BENCSIK D., GRÓSZ GY., GRÓSZ T., URBÁNYI B. (2010) A hosszú távú fluorid terhelés szívműködésre gyakorolt hatásainak vizsgálata zebra-dánió (*Danio rerio*) elektrokardiográfia segítségével XXXIV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, : 33.
- BAKOS K., **CSENKI ZS.**, KOVÁCS R., KÁNAINÉ SIPOS D., MÜLLER F., YAVOR H., KOVÁCS B., URBÁNYI B. (2010) Multikolor zebra-dánió alapú tesztrendszer toxikológiai vizsgálatokhoz XXXIV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, : 32.
- BENCSIK D. KOVÁCS R., HORVÁTH Á., PELYHE CS., PÉCS N., GAZSI GY., URBÁNYI B., **CSENKI ZS.** (2010) A nátrium-fluorid sejtosztódásra gyakorolt hatásának és a szövetregenerációs folyamatok toxikológiai célú felhasználásának vizsgálata zebra-dánió (*Danio rerio*) halfajon XXXIV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, : 31.
- VARADI L., BUZA E., **CSENKI ZS.**, JENEY ZS., MULLER T., URBÁNYI B., MEZES M. (2010) Low dose cinnamaldehyde increase the survival time in different stress conditions in zebrafish (*Danio rerio*) model system, 2nd International Conference on Drug Discovery and Therapy. Dubai, 1-4 February Poster „165”
- BÚZA E., VÁRADI L., **CSENKI ZS.**, MÜLLER T., MÉZES M. (2010) Ismétlődő stressz hatásainak vizsgálata zebra-dánió (*Danio rerio*) halfajon XXXIV. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 22-23
- KOVÁCS R., URBÁNYI B., KOVÁCS B., BENCSIK D., STASZNY Á., HEGYI Á., **CSENKI ZS.** (2009): A zebra-dánió (*Danio rerio*) mint a toxikológiai vizsgálatok modellállata, II. Gödöllői Állattenyésztési Tudományos Napok, Gödöllő
- MÉSZÁROS E., HEGYI Á., **CSENKI ZS.**, KOVÁCS R., LEFLER K.K., URBÁNYI B. (2009) Malchitzöld-oldat hatása zebra-dánió (*Danio rerio*) halfajban XXXIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 54.
- BENCSIK D., BASKA F., **CSENKI ZS.**, URBÁNYI B., SZABÓ T. (2009) A fokhagymakivonat felhasználásának lehetőségei a haltenyésztésben XXXIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 45

- KOVÁCS R., **CSENKI ZS.**, KOVÁCS B., STASZNY Á., HEGYI Á., URBÁNYI B. (2009): A zebra-dánió (*Danio rerio*), mint a toxikológiai vizsgálatok modellállata, Magyar Hidrológiai Társaság XXVII. Országos Vándorgyűlés, Baja
- VÁRADI L., HEGYI Á., TRENÓVSZKI M., BALOGH K., **CSENKI ZS.**, KISS I.(2008): Karotinoid tartalmú tápkiegészítő előállítás tejjipari melléktermékekből és ezek hatása a halakra. XXXII. Halászati Tudományos Tanácskozás 51-52.
- SZABÓ I., HÁHN J., KOVÁCS R., KRIFATON CS., **CSENKI ZS.**, URBÁNYI B. (2008): Environmental research programs of the Regional University Center of Excellence in Szent István University, Hungary, 1st German-Hungarian Conference on Research for Sustainability, Budapest,
- HEGYI Á., LEFLER K. K., **CSENKI ZS.**, TÓTH B., BÉRES T., URBÁNYI B. (2007) A szérum/plazma fruktózamin (SeFa) évszakos váltakozása természetes és akváriumi körülmények között XXXI. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 38.
- HEGYI Á., LEFLER K.K., **CSENKI ZS.**, HORVÁTH Á., URBÁNYI B. (2007): New potentials for the detection of long-term stress in freshwater fish species. Budapest Meeting Abstracts. 2007. *Cell Stress Chaperones* online 12: 292-293. (5H_10_P)
- KOVÁCS B., **CSENKI ZS.**, HEGYI Á., VÁRADI L. (2005): Karotinoid etetések komplex hatása néhány gazdaságilag fontos halfajra (ezüstkárász, ponty és szivárványos pisztráng), XXIX. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, : 13.
- HEGYI Á., VÁRADI L., BÉRES T., KOVÁCS É., **CSENKI ZS.**, TÓTH B., OPPEL K. (2005): Oxigénhiányos környezet által kiváltott stressz vizsgálata és mérése három halfajon, XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 35-44.
- HEGYI Á., VÁRADI L., BÉRES T., KOVÁCS É., **CSENKI ZS.**, TÓTH B., OPPEL K. (2004): Oxigénhiányos környezet által kiváltott stressz vizsgálata és mérése három halfajon, XXVIII. Halászati Tudományos Tanácskozás, Szarvas, 19.