

PETEFÉSZEK INSZEMINÁCIÓ UTÓDGENERÁCIÓRA GYAKOROLT IMMUNOLÓGIAI KÖVETKEZMÉNYEINEK VIZSGÁLATA ZEBRADÁNIÓBAN (*DANIO RERIO*) (ELŐZETES EREDMÉNYEK)

**IVÁNOVICS Bence¹, CSENKI-BAKOS Zsolt¹, HORVÁTH József²,
VARGA Ádám², URBÁNYI Béla³, MÜLLER Tamás²**

¹*Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Környezettoxikológia Tanszék, 2100 Gödöllő,
Páter K. utca 1.*

²*Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Természetesvízi Halökológiai Tanszék, 2100
Gödöllő, Páter K. utca 1., e-mail: muller.tamas@uni-mate.hu*

³*Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és
Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék, 2100 Gödöllő,
Páter K. utca 1.*

Kivonat

A petefészek inszemináció egy olyan új halszaporítási megközelítés és módszer, amely mind a természetvédelem mind a halgazdálkodás számára előremutató lehetőségeket kínál. Ugyanakkor kiemelten fontos, hogy feltérképezzük a sperma injektálás módszere által termékenyült utódgeneráció életképességét, különös tekintettel annak immunrendszerére. Ezért egy széles körben alkalmazott modellhalfaj, a zebradánió (*Danio rerio*) segítségével vizsgáltuk a különböző immunrendszer és gyulladás asszociált gének kifejeződésére, illetve a neutrofil granulocitákra gyakorolt hatásokat az utódgenerációban. Az injektált sperma által termékenyült utódok normális embrionális fejlődést mutattak és nem tapasztaltunk statisztikailag igazolható eltéréseket sem a markergének kifejeződésében, sem a neutrofil granulociták eloszlásában. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az általunk kialakított petefészek inszeminációs módszer a vizsgált paraméterek tekintetében nem befolyásolja szignifikáns mértékben a zebradánió embriók/lárvák veleszületett immunrendszerét.

Kulcsszavak: petefészek, inszemináció, zebradánió, immunrendszer

Abstract

The ovarian insemination is a novel approach and method for fish reproduction, offering promising opportunities for both conservation and fisheries management. However, it is crucial to assess the viability of offspring generated through sperm injection, particularly concerning their immune system. Therefore, we investigated the expression

of various immune system and inflammation-associated genes, as well as the effects on neutrophil granulocytes in the F1 generation, using the widely used model species, zebrafish (*Danio rerio*). Embryos fertilized by injected sperm exhibited normal embryonic development, and we did not observe statistically significant differences in the expression of marker genes or the distribution of neutrophil granulocytes. Based on our results, it can be assumed that our developed ovarian insemination method does not significantly influence the innate immune system of zebrafish embryos/larvae in terms of the parameters investigated.

Keywords: ovary, insemination, zebrafish, immune system

Bevezetés

A halsperma mesterséges módon, petefészekbe történő injektálása (petefészek inszemináció) olyan halszaporítási módszert kínál külső termékenyüléssel szaporodó halfajok esetén, amely előnyöket biztosíthat veszélyeztetett halfajok megőrzése során, valamint a halgazdálkodás egyes szegmenseiben egyaránt. Mivel a petefészek inszemináció esetén tetszőleges számú hímtől nyerhető sperma és injektálható a kiválasztott nőstény(ek) petefészébe, így növelhető az utódgeneráció genetikai diverzitása. A módszer alternatívát nyújthat azokban az esetekben, amikor a természetes ivás nem történik meg vagy a hagyományos szaporítási módszerek sikertelennek bizonyulnak. A petefészek inszemináció általi szaporítást zebraadánió és afrikai harcsa segítségével sikeresen modelleztük (Gazsi et al. 2021a, 2021b; Quyén et al. 2022). Mindezek alapján különösen fontossá válnak azok a további kutatómunkák, amelyek az injektált sperma által termékenyült utódok vitalitásában megmutatkozó potenciális eltéréseket helyezik fókuszba. Az ilyen irányú vizsgálatok nem csupán a módszer alkalmazásának biológiai következményeiről adhatnak részletesebb információkat, hanem párhuzamosan annak kifinomítását is szorgalmazzák.

A petefészek inszemináció utódok vitalitására gyakorolt hatásainak vizsgálata során érdemes figyelmet szentelnünk az F1 generáció immunrendszerében bekövetkező potenciális eltérések detektálására. A nem megfelelően működő immunrendszer a különböző fertőzésekkel, patogén ágensekkel és egyéb stresszhatásokkal szembeni fogékonyságot és ezzel együtt a mortalitás növekedését vonhatja maga után (Tort 2011; Bayha et al. 2017).

Kutatómunkánk célul tűzte ki a petefészekbe történő spermainjektálás utódok immunrendszerére gyakorolt hatásainak feltérképezését. Ehhez egy széles körben alkalmazott modellhalfajt, a zebraadániót hívtuk segítségül. Kíváncsiak voltunk arra, hogy milyen különbségek mutatkoznak meg az injektált sperma által termékenyült utódok immunrendszer és gyulladás asszociált marker génjeinek kifejeződésében a kontroll csoportokhoz viszonyítva. Mindemellett, fluoreszcens mikroszkópos képalkotás és transzgénikus zebraadánió vonal bevonásával vizsgáltuk a neutrofil granulociták eloszlását az embriókban.

Anyag és módszer

A kísérletekhez alkalmazott zebraadánió szaporító állomány a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet (Gödöllő)

recirkulációs rendszerű Zebradániós laboratóriumában volt fenntartva, 14 óra megvilágított – 10 óra sötét periódus mellett. A recirkuláló, szűrt és UV-sterilizált rendszervíz paraméterei az alábbiak voltak: 25.5 ± 0.5 °C hőmérséklet, 500 ± 50 μ S vezetőképesség, 7 ± 0.5 pH. A halak ivatását a fényperiódus első pár órája során, speciális rácsos aljú 1 l-es ivató kádakban hajtottuk végre. A petefészek inszeminációt sztereo mikroszkóp alatt, altatásban (minden esetben 168 mg/l trikain-metánszulfonát) végeztük. Elsőként az altatásba vitt transzgenikus (fluoreszcens jelet kibocsátó, Tg(MPX:EGFP)) hímektől üvegkapilláris segítségével spermát nyertünk, majd a több hím-től összegyűjtött, kevert spermát (pool) kapilláris-töltő pipettahegy és automata pipetta segítségével az altatott AB-típusú laboratóriumi (fluoreszcens jelet nem kibocsátó) nőtények petefészkebe injektáltuk (kb. 1 μ l sperma / nőtény). A nőtények az injektálást követően friss rendszervizet tartalmazó „ébresztő” kádakba kerültek, majd pedig az altatásból történő teljes visszatérés után ivató kádakba helyeztük át őket, laboratóriumi AB-típusú hímek mellé (az ivási folyamat biztosítása érdekében). Az injektált spermával termékenyült utódok így fluoreszcens mikroszkóp alatt elkülöníthetővé váltak. A kontroll csoportot a hagyományos ivatással (jelen esetben 1 hím és 1 nőtény ivása) termékenyült embriók/lárvák képezték. A technikai kontroll csoport esetén az injektálás műveletét elvégeztük, de nem történt sperma bejuttatása a petefészekbe. Pozitív kontrollként réz-szulfát által indukált gyulladási modellt állítottunk be, amelynek során a mintavételi időpontot (termékenyülést követő 5. nap) megelőző 6 vagy 12 óra során a lárvákat 3,2 mg/l réz-szulfát (CuSO₄) oldatban inkubáltuk.

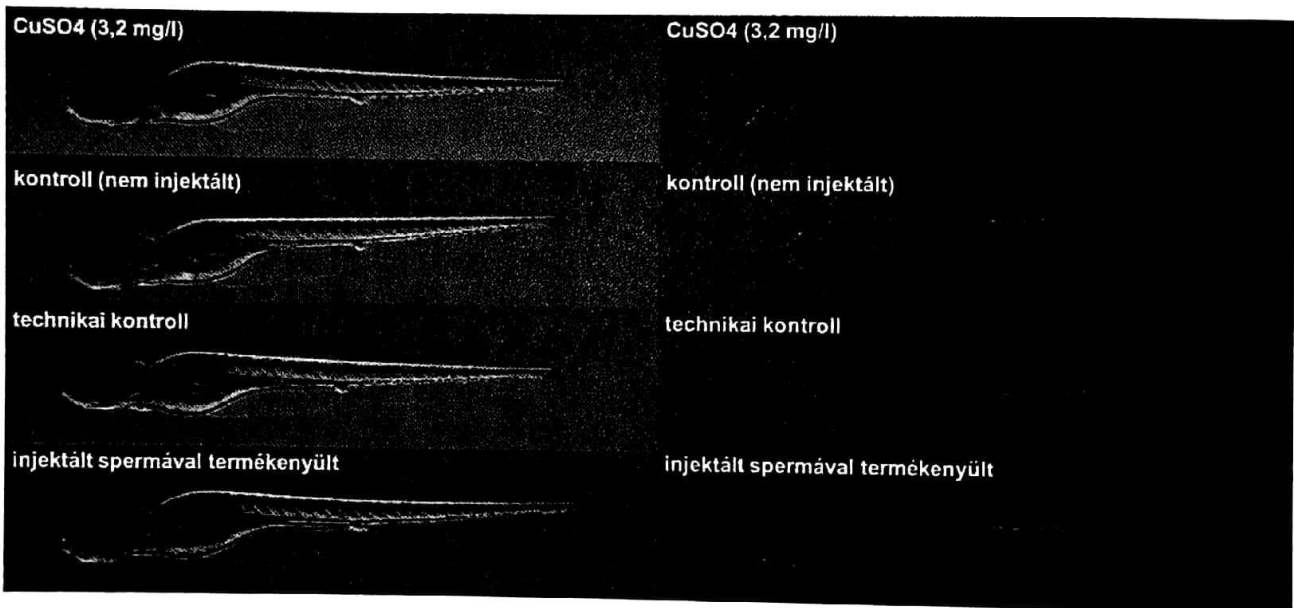
Az embrionális fejlődés végén (termékenyülést követő 5. napon) fluoreszcens mikroszkóp (Leica M205 FA) alatt oldalnézeti fényképeket készítettünk a lárvákról. A fényképek alapján megfigyeltük az esetlegesen bekövetkező test-torzulásokat és a neutrofil granulociták lárvákon belüli eloszlását. Az eloszlásbeli különbségek számszerűsítése érdekében, ImageJ szoftver segítségével meghatároztuk az oldalvonal régió mentén akkumulálódó neutrofil granulocita sejtszámot (EGFP+ sejtek). Az immunrendszer és gyulladás asszociált marker gének kifejeződésének méréséhez az 5 napos (termékenyüléstől számított) zebradániókat mikrocentrifuga csövekben, TRIzol reagensben homogenizáltuk (8 lárv/cső), majd pedig kloroform-izopropanol-os RNS izolálást végeztünk. Az izolált RNS minőségét és mennyiségét NanoDrop-One (Thermo Scientific) készülékkel határoztuk meg. A cDNS szintézist High Capacity cDNA reverz transzkripció kit (Applied Biosystems) segítségével végeztük. A marker gének kifejeződését EvaGreen-qPCR Supermix (Solis BioDyne) által LightCycler 480 készülékben mértük, és az adott expressziós szinteket a háztartási génnel (*efl1a*) történő normalizálást követően adtuk meg.

Az eredmények statisztikai elemzését az adatok eloszlásától függően Kruskal-Wallis teszttel vagy egyutas ANOVA segítségével hajtottuk végre. Az eredményeket átlag \pm szórás formában ábrázoltuk. Statisztikailag igazolható különbség $p < 0.05$ esetén lett meghatározva.

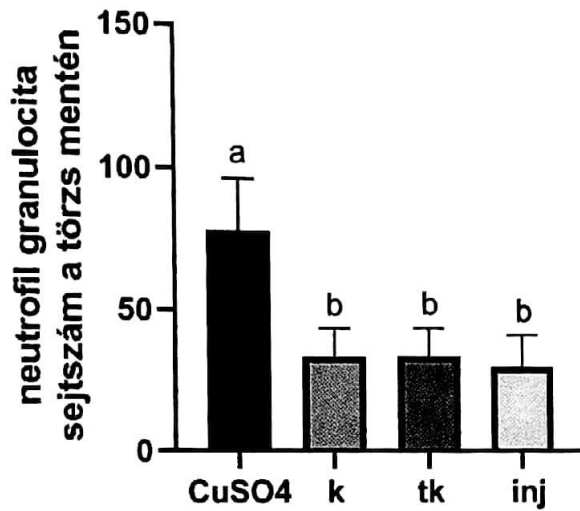
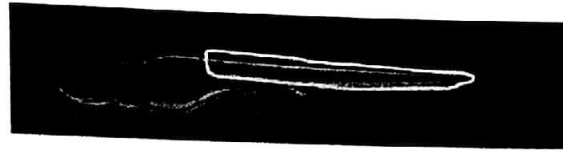
Eredmények és következtetések

Az injektált spermával termékenyült utódok nem mutattak szemmel látható drasztikus morfológiai elváltozásokat, ahogy az a kontroll csoportokban sem volt megfigyelhető.

(1. ábra). A réz szulfát által kiváltott gyulladás (pozitív kontroll) a neutrofil granulociták szemmel látható, erőteljes szóródását eredményezte a lárvákon belül, amely a legszembetűnőbb mértékben a törzs területén, illetve az oldalvonal mentén mutatkozott meg. A granulocitáknak ez a típusú, gyulladásos folyamatokat jelző eloszlása jól elkülöníthető volt az összes többi csoporttól, függetlenül attól, hogy injektált vagy nem injektált sperma által termékenyült az utód (1. ábra). A lárvák törzse, illetve oldalvonala mentén akkumulálódó neutrofil granulociták számszerűsítése esetén is megfigyelhetjük, hogy az injektált sperma által termékenyült utódokban nem volt szignifikáns különbség a (nem injektált és technikai) kontroll csoportokhoz képest (2. ábra). A pozitív kontroll (réz-szulfát expozíció) viszont statisztikailag igazolható mértékben elkülönül minden más csoporttól (2. ábra).

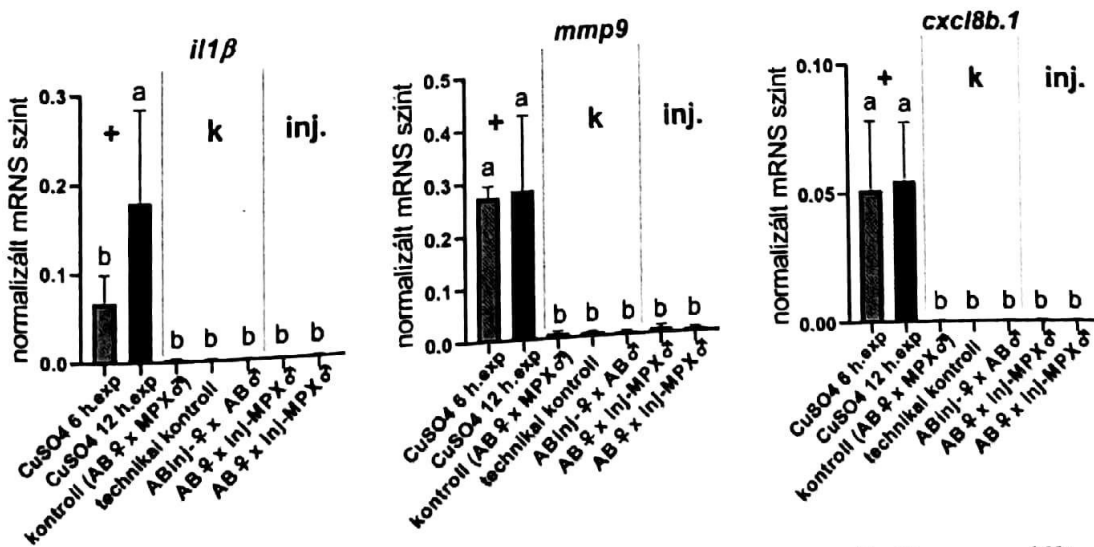


1. ábra. Petefészek injektálás hatása az F1 generáció lárváinak morfológiájára (bal oldal) és a neutrofil granulociták eloszlására (jobb oldal) zebradánióban. Pozitív kontroll: CuSO₄ által indukált gyulladás.



2. ábra. Petefészek injektálás hatása a neutrofil granulociták eloszlására az F1 generációban, zebradánió lárvákban. Pozitív kontroll: CuSO₄ által indukált gyulladás. Az EGFP-pozitív sejtek száma a felső képen jelölt területre vonatkozóan lett meghatározva. k: nem injektált kontroll, tk: technikai kontroll, inj: injektált sperma által termékenyült. Statisztikailag igazolható különbséget az eltérő betűk jelölik.

Az immunrendszer és gyulladás-asszociált markergének kifejeződése tekintetében szintén nem tapasztaltunk számottevő különbségeket az injektált spermával termékenyült csoport és a nem-injektált (kontroll), technikai kontroll, illetve az injektálást követően nem az injektált spermával, hanem az ivatáshoz alkalmazott hímtől származó spermával termékenyült csoportokhoz képest (3. ábra). A rész-szulfát expozíció (pozitív kontroll) ugyanakkor, a vártnak megfelelően, kiemelkedő mértékben indukálta a vizsgált gének kifejeződését (3. ábra).



3. ábra. Petefészek injektálás hatása egyes immunrendszer és gyulladás asszociált gének kifejeződésére az F1 generációban, zebradánió lárvákban. +: pozitív kontroll, k: kontroll kifejeződésére az F1 generációban, zebradánió lárvákban. Statisztikailag igazolható különbséget az csoportok, inj: injektált sperma által termékenyült. Statisztikailag igazolható különbséget az eltérő betűk jelölik.

Összefoglalás

Kutatómunkánk külső termékenyüléssel szaporodó halakon kialakított, petefészkekbe történő sperma-injektáláson alapuló mesterséges halszaporítási módszer utódok immunrendszerére gyakorolt hatásait vizsgálta zebradánió, mint modellszervezet. Összességében elmondható, hogy az injektált sperma által termékenyült utódok kontroll körülmények között tapasztalt, normális embrionális fejlődést mutattak. Gyulladásra és az immunrendszer befolyásolására utaló jeleket nem tapasztaltunk a vizsgált markergének kifejeződése, illetve az embriók veleszületett immunrendszerének egyik fő képviselői, a neutrofil granulociták eloszlása tekintetében. Minden vizsgálati csoport egységesen eltért az általunk pozitív kontrollként beállított gyulladás-indukált csoporttól. Munkánk folytatásaként a továbbiakban vizsgálni kívánjuk a petefészkek inszemináció anyai szervezetre gyakorolt hatásait és annak immunológiai következményeit.

Köszönetnyilvánítás

Szeretnénk megköszönni a MATE Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet munkatársainak a kutatómunkánk során nyújtott segítségüket! Munkánk a Kulturális és Innovációs Minisztérium ÚNKP-23-4-II-MATE-4; ÚNKP-23-3-I-MATE/22 és ÚNKP-23-2-I-MATE-6 kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával, valamint az NKFI K-135824 kódszámú OTKA pályázat támogatásával készült.

Irodalom

- Bayha, K. M., Ortell, N., Ryan, C. N., Griffitt, K. J., Krasnec, M., Sena, J., Griffitt, R. J. 2017. Crude oil impairs immune function and increases susceptibility to pathogenic bacteria in southern flounder. *PloS one*, 12(5), e0176559
- Gazsi, G., Butts, I. A., Zadmajid, V., Ivánovics, B., Ruffilli, L., Urbányi, B., Müller, T. 2021. Ovarian inseminated sperm impacts spawning success in zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) even in the absence of a male stimulus. *Theriogenology*, 172, 315-321.
- Gazsi, G., Ivánovics, B., Izabella, R. B., Szabó, T., Daniel, Z., Kucska, B., Müller, T. 2021. Artificial sperm insemination in externally fertilised fish as a novel tool for ex situ and in situ conservation of valuable populations. *Endangered Species Research*, 45, 169-179.
- Quyén, N. N., Alebachew, G. W., Kucska, B., Kovács, G., Halasi-Kovács, B., Ferincz, Á., Müller, T. 2022. Model experiment for practical application of inseminated sperm method for production of interspecific hybrids (*Clarias gariepinus* × *Heterobranchus longifilis*). *Aquaculture Reports*, 27, 101418.
- Tort, L. 2011. Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 35(12), 1366-1375.