

CSONTOSHALAK ŐSIVARSEJTJEINEK, SPERMATOGÓNIUMAINAK ÉS OOGÓNIUMAINAK MÉLYHÚTÉSE ÉS ÁTÜLTETÉSE

HORVÁTH ÁKOS – MARINOVIĆ ZORAN – LUJIĆ JELENA – KITANOVIĆ NEVENA –
ŠČEKIĆ ILIJA – HOITSY GYÖRGY – URBÁNYI BÉLA

ÖSSZEFOGLALÁS

A különböző korai fejlődési stádiumú ivarsejtek (primordiális ősvarsejtek, spermatogóniumok és oogóniumok) manipulációja jó megoldást jelenthet a különböző halfajok, -fajták genetikai tartálékainak *ex situ* megőrzésére. Ezek a sejtek diploidok és számos őssejtekre jellemző tulajdonsággal rendelkeznek. Képesek vándorolni, kolonizálni az ivarszerveket és azokban megtapadva elindítani a gametogenezis folyamatát. A mélyhűtést követő jó túlélésüknek köszönhetően alternatívát nyújtanak az ivarsejtek mélyhűtéséhez, ami halakban a spermiumokra korlátozódik. A korai fejlődési stádiumú ivarsejtek akár intra- akár interspecifikus átültetését követően a recipiensek a donortól származó ivarsejteket termelik, míg az ivarsejtek típusát (spermium vagy petesejt) a recipiens ivara határozza meg. Munkájukban a szerzők bemutatják a halak korai fejlődési stádiumú ivarsejtjeinek izolációjával, mélyhűtésével és átültetésével kapcsolatos főbb eredményeket.

Summary

Horváth, Á. – Marinović, Z. – Lujic, J. – Kitanović, N. – Ščekić, I. – Hoitsy, Gy. – Urbányi, B.:
CRYOPRESERVATION AND TRANSPLANTATION OF PRIMORDIAL GERM CELLS, SPERMATOGONIA
AND OOGONIA OF TELEOST FISH

Manipulation of early-stage germ cells (primordial germ cells, spermatogonia and oogonia) presents a viable solution for the *ex situ* conservation of genetic resources of various fish species and populations. These cells are diploid and possess several characteristics of stem cells. They are able to migrate, colonize gonads and proliferate in them. Due to their good cryoresistance, they represent a viable alternative to gamete cryopreservation which is restricted to sperm in fish. Following intra- or interspecific transplantation of early-stage germ cells, the recipients produce donor-derived gametes where the types of gametes (sperm or eggs) depend on the sex of the recipient. In this study, the most important results of the isolation, cryopreservation and transplantation of early-stage germ cells in fish are reviewed. Research in this field has begun on primordial germ cells (PGC-s) which were isolated from the genital ridges of fish larvae. Creation of transgenic lines expressing GFP driven by the *vasa* protein gene enabled detection of early-stage germ cells in donors and recipients. Due to the limited availability of PGC-s, attention was later focussed on spermatogonial and oogonial stem cells which are found in abundance in juvenile and adult fish, as well. These cells can be cryopreserved either in the form of isolated cell suspensions or as gonadal tissue. Vitricification of gonadal tissue pieces has also been tested with satisfactory results. Special attention must be paid to the selection of recipients. Ideally, recipients should be related to the donor, easy to culture and sterile. Sterility can be attained by various methods including triploidization, *knock-out* or *knock-down* of genes involved in the migration of PGC-s using morpholino oligonucleotides, hybridization of species as well as depletion of gonads of adult fish by chemical treatment. Methods presented above provide an additional tool to the conservation of genetic resources of both cultured as well as natural populations of fish.

BEVEZETÉS

Az ivarsejtek mélyhűtése a biológiai idő megállítását szolgálja az adott sejtek számára, ami lehetővé teszi felhasználásukat emberi léptékkal mérve korlátlan ideig (Tiersch, 2011). A mélyhűtési technológiák a genetikai tartalékok megőrzésének hatékony eszközei, felhasználásuknak mind állattenyésztési, mind környezetvédelmi területen fontos szerepe van. Az állattenyésztésben a legáltalánosabban mélyhűtésre kerülő sejtípus a spermium, illetve kisebb mértékben a petesejtek és embriók. A halak esetében azonban, csak a sperma mélyhűthető, az ikra vagy embriók mélyhűtésére a mai napig nem rendelkezünk hatékony, működő módszertannal. Így a hosszú távú génmegőrzés kizárólag a sperma mélyhűtésére hagyatkozhat, amivel lehetetlen az adott faj, fajta vagy egyéb veszélyeztetett csoportok helyreállítása (Martínez-Páramo és mtsai, 2017).

Érthető tehát, hogy az utóbbi két évtizedben a kutatók figyelme az egyéb, korábbi fejlődési stádiumú ivarsejt-típusok felé irányult. Ide tartoznak a primordiális ősvarsejtek (primordial germ cells – PGC), illetve a differenciáció korai szakaszában lévő spermatogóniumok és oogóniumok. Ezek a sejtek diploidok, hordozzák az adott populáció teljes genetikai információját, és ami még fontosabb, képesek vándorolni, kolonizálni a fejlődő ivarmirigyeket és ott felszaporodva ivarsejtek későbbi nemzedékeivé fejlődni. Ezek a sejtek izolálhatók, mélyhűthetők, majd átültethetők közeli rokon recipiensekbe, ahol felszaporodva a donor ivarsejtjeit fogják termelni – a recipiens ivarától függően. A recipiensek sterilizációja révén azok kizárólag a donortól származó ivarsejteket fogják mintegy dajkanevelésben megtermelni (Takeuchi és mtsai, 2004; Yoshizaki és mtsai, 2011).

A módszer alkalmazási potenciálja elviekben rendkívül széles körű. Az ősvarsejtek és korai fejlődési stádiumú ivarsejtek mélyhűtése, átültetése és dajkanevelése lehetővé teszi fajok, fajták, populációk megmentését akár egyetlen fennmaradt hím egyed felhasználásával. A módszer használata megkönnyítheti egyes nehezen, szaporítható fajok ivarsejt-termelését. Lassú ivaréretsű fajok (pl. tokfélék) esetében felgyorsíthatja az ivarsejtek kinyerését és így az ivadék létrehozását.

Munkánkban bemutatjuk a csontoshalakból izolált ősvarsejtek, spermatogóniumok és oogóniumok mélyhűtése és átültetése során eddig elért eredményeket. Taglaljuk a rendszertani csoportok közti különbségeket, illetve a módszertan jelenleg ismert korlátait.

A PRIMORDIÁLIS ŐSVARSEJTEK

A halak primordiális ősvarsejtjei (PGC) az ivarszerveken kívül alakulnak ki és az embrionális fejlődés során vándorolnak a hasüregben lefűződő ivari redőkbe (Robles és mtsai, 2017). A PGC-k nagyméretű, 10-20 μm átmérőjű sejtek, szintén nagy, 6-10 μm méretű sejtmaggal. A PGC-k egyik jellegzetessége az u.n. csíraplazma, egy elektronsűrű terület, amely általában a mitokondriumokkal áll összefüggésben. A csíraplazma számos olyan fehérjének, RNS-nek (*vasa*, *nanos*) ad otthont, amelyek kizárólag a csírasejtekre jellemzők és a PGC-k zavartalan működéséhez, vándorlásához fejlődéséhez szükségesek (Yoshizaki és mtsai, 2003). Ezek hiányában a PGC-k vándorlása zavart szenved és nem jutnak el az ivari redőbe. Egyes halfajokban, pl. a zebrafishban (*Danio rerio*) a PGC-k száma

az egyed ivarát is meghatározza, mivel egy bizonyos sejtszám alatt az egyedek elsősorban hímmé differenciálódnak (Tzung és mtsai, 2015).

A kutatók a primordiális ősvarsejtek fent felsorolt tulajdonságait használták ki az első vizsgálatok végrehajtásához. Az első lépésben láthatóvá kellett tenni a PGC-ket a jobb megkülönböztethetőségük és nyomon követhetőségük érdekében. Ehhez a korábban már említett vasa fehérjét használták fel, amelynek génjéhez (illetve annak szabályozó régiójához) a zöld fluoreszcens fehérje (GFP) génjét kötötték, így az megjelelő zöld fluoreszcencia jelezte a csírasejt-vonal jelenlétét már a fejlődő embriókban is. Ilyen vasa-GFP transzgénikus vonalakat hoztak létre szivárványos pisztrángban (*Oncorhynchus mykiss*, Yoshizaki és mtsai, 2000, 2002), zebradánióban, színjátzó dánióban (*Danio albolineatus*), aranyhalban (*Carassius auratus*), mandzsucsikban (*Misgurnus anguillicaudatus*), medakában (*Oryzias latipes*), heringben (*Clupea pallasii*), a *Leucopsarion petersii* gébfajban (Saito és mtsai, 2006) és az ázsiai rózsaszín durbincsban (*Pagrus major*, Lin és mtsai, 2012). Ennek révén az ősvarsejtek már az embrionális korban láthatóvá váltak a halak szervezetében, illetve a vándorlásuk is követhetővé vált az embrionális fejlődés során.

A következő lépés az elegendő mennyiségű PGC izolációja volt, ami elengedhetetlen a sikeres további alkalmazásokhoz, pl. a mélyhűtéshez vagy az átültetéshez. Ez különös kihívást jelentett, mivel a PGC-k kizárólag lárva- (vagy embrionális) korú halaktól nyerhetők ki. A kihívást itt a lárvák felboncolását követően az ivari redők kioperálása jelenti, hiszen ezek még a viszonylag nagyméretű pisztráng-lárvákban is legfeljebb 2-3 mm hosszúságú és alig két sejtretegnyi vastagságú szervek. A sejtek izolációja során kapott PGC-ket sejtszorterrel lehet elkülöníteni az őket körülvevő szomatikus sejtektől, ami természetesen feltételezi a fluoreszcens transzgénikus egyedek meglétét (Takeuchi és mtsai, 2002).

A PGC-k mélyhűtésére több okból is szükség lehet. A kézenfekvő génmegőrzési szempontokon túl a mélyhűtés lehetővé teszi a kutatómunka összehangolását, a nagy mennyiségű sejt egyidejű felhasználását, mivel a donor és recipiens eredetű ivarsejtek nem mindig állnak egy időben megfelelő mennyiségben rendelkezésre. A közvetlenül ősvarsejteket tartalmazó sejtszuspenzió mélyhűtése nem elterjedt, helyette a lárvákból eltávolított ivari redők mélyhűtése jelent gyakorlati megoldást. A szivárványos pisztráng ivari redőinek 1,8 M etilén-glikol (EG) védőanyag használatával végzett mélyhűtése során, Kobayashi és mtsai (2003) 73% túlélő sejtet találtak a felolvasztást követően. Néhány évvel később ugyanezen módszer használatával már sikeresen ültették át a felolvasztott PGC-ket és nyertek ki donortól származó ivarsejteket, majd utódokat (Kobayashi és mtsai, 2007). Sikeresen alkalmazták az egész zebradánió-embriók vitrifikációját is. Dimetil-szulfoxid (DMSO) vagy EG védőanyagok használatával a 14-20 szomitás zebradánió-embriókban a PGC-k 20-40%-a túlélte a hűtést és felolvasztást (Higaki és mtsai, 2010a). Ezt az arányt később 81%-ig tudták javítani a szikanyag egy részének eltávolításával (Higaki és mtsai, 2013), majd az izolált sejteket sterilizált recipiens embriókba átültetve és azokat felnevelve a donortól származó ivadékokat nyertek (Higaki és mtsai, 2010b). A vitrifikációs kísérleteket később mandzsucsik embrióival is elvégezték és a módszer sikerességét transzplantációs vizsgálatokkal is igazolták (Inoue és mtsai, 2012).

A SPERMATOGÓNIUMOK

A spermatogóniumok a PGC-kből fejlődnek ki az ivarszervek differenciálódása során és ezek a sejtek már a kifejlett egyed heréiben annak élete végéig jelen vannak. A spermatogóniumoknak számos fejlődési stádiuma található meg az ivarszervekben, pl. a zebradánióban legalább 5 spermatogóniális lépést figyelhetünk meg, amelyek 9 nemzedéket alkotnak (Schulz és mtsai, 2010). Manipulációra elsősorban a differenciálatlan A-típusú spermatogóniumok alkalmasak, amelyek számos, az őssejtekre jellemző tulajdonsággal rendelkeznek. Ezek a spermatogóniumok – hasonlóan a PGC-khez – a környezetüktől függően akár hím, akár női ivarsejttekké tudnak differenciálni, illetve korlátozott mértékig ugyan, de megőrzik vándorlási képességüket is (Yoshizaki és mtsai, 2011). Egyértelmű előnyük a PGC-kkel szemben, hogy az egyed élete során folyamatosan és nagy számban jelen vannak az ivarmirigyekben. A GFP-t expresszáló PGC-kből fejlődő spermatogóniumokban, sőt az azokból kialakuló további stádiumokban a zöld fluoreszcens jel megmarad (Okutsu és mtsai, 2007), így a sejtek fejlődése jól nyomon követhető és az izolált ivarsejtek jól elkülöníthetők az őket körülvevő szomatikus sejtektől.

A spermatogóniumok izolációja már nagyobb kihívást jelent, mint a PGC-ké, mivel – különösen az ivarérett egyedek heréiben – egyszerre több ivarsejt-stádium is jelen van. Átültetéskor a célunk elsősorban a spermatogóniumok bejuttatása a recipiens szervezetbe, hiszen a későbbi fejlődési stádiumok kevésbé valószínű, hogy megtapadnak és fejlődni tudnak az ivarszervekben. Az izolációban nagy segítséget jelent, ha az egyedek már viszonylag nagy testméretűek, de még nem ivarérettek, mivel az ivarszerveik ilyenkor többségében A típusú spermatogóniumokat tartalmaznak (Marinović és mtsai, 2017, Lujic és mtsai, 2018). Kifejlett egyedek esetében bizonyos mértékig megoldást jelenthet a Percoll grádiensben való centrifugálás. Lénai tok (*Acipenser baerii*) ivarsejtjeit 76-82%-os hatékonysággal izolálták 10-30% Percoll segítségével, azonban a tokfélékre jellemző spermatogónium-specifikus markerek hiányában ezeket csak a szomatikus sejtektől tudták hatékonyan elkülöníteni, a későbbi fejlődési stádiumú ivarsejtektől nem (Pšenička és mtsai, 2015). Saját tapasztalataink szerint ugyanakkor a Percoll grádiens használata nehézkes és nem ad kielégítő eredményt az ivaréretlen halakból végzett izolációval szemben. Jobb eredménnyel járnak a különböző spermatogónium-specifikus génexpressziót vagy antitesteket kimutató eljárások, amelyeket sejtenyészteségi vagy szorteres (akár mágneses, akár fluoreszcens) módszerekkel kombinálva tisztább sejtszuspenziókhoz juthatunk (Lacerda és mtsai, 2014).

Kis testméretű fajok esetében a kifejlett egyedekből kinyerhető spermatogóniumok száma is korlátozott, ami a későbbi átültetés során jelenthet kockázatot. Ilyenkor megoldást jelent a sejtek számának növelése sejtenyészteses technikákkal. Japán kutatók a szivárványos pisztráng spermatogóniumainak számát tudták *in vitro* növelni az eredeti sejtszám 37,8-szorosára 28 napos sejtenyésztesést követően. Ehhez először a herében található és spermatogenezis számára kucsfontosságú Sertoli-sejtekből hoztak létre egy tenyészetet, majd erre ültették rá a felszaporítani kívánt sejteket. A tenyésztés sikerességét később átültetési vizsgálatokkal is igazolták (Iwasaki-Takahashi és mtsai, 2020).

A spermatogóniumok mélyhűtésére is számos eljárást dolgoztak már ki. A leggyakrabban alkalmazott eljárások a sejtsuszpenziók vagy a komplett ivarszervek, illetve ivarszerv-darabok mélyhűtése. A compó (*Tinca tinca*) és aranyhal esetében fajspecifikus különbséget figyeltünk meg a két fent említett mintatípus fagyasztásakor. Amíg a compó korai fejlődési stádiumú ivarsejtjei hasonló túlélést mutattak szuszpenzióban és ivarszervben, addig az aranyhal esetében a túlélés egyértelműen magasabb volt a sejtsuszpenzióban. A felolvasztott ivarszervek szövettani feldolgozása ugyanakkor bebizonyította, hogy a fagyasztás nem okoz jelentős minőségi változást a herék szerkezetében (Marinović és mtsai, 2017). A zebradánió esetében jó eredményre vezetett az akupunktúrás tűre húzott egész herék vitrifikációja, amelyet 5 különböző mutáns vagy transzgénikus vonalban a spermatogóniumok több, mint 50%-a élt túl. A vitrifikáció ráadásul a felolvasztást követően tisztább sejtsuszpenziót is eredményezett, mivel a herében nagy számban jelenlévő és a későbbi munkához (átültetéshez) felesleges, sőt zavaró spermiumok nem éltek túl a vitrifikációs folyamatot, míg a fagyasztásos eljárások esetében spermiumok is jelen voltak a felolvasztott herékben (Marinović és mtsai, 2018, 2019). Ponty hereszövet mélyhűtésekor ugyanakkor a vitrifikáció kb. négyszer gyengébb túlélést eredményezett, mint a fagyasztás. Véleményünk szerint ez a ponty heréjében jelenlévő és a zebradánióhoz képest többszörösen nagyobb számú spermiumnak tudható be, ami a mélyhűtés során rontja a vitrifikáció hatékonyságát (Franěk és mtsai, 2019a).

A spermatogóniumok mélyhűtésére ugyanakkor egészen extrém példák is léteznek. Japán kutatók először a komplett szívárványos pisztráng herék mélyhűtésére dolgoztak ki eljárást és 939 nap fagyasztott tárolást követően is tudtak sikeresek átültetni izolált spermatogóniumokat (Lee és mtsai, 2013). Ezt követően bódítószerrel túlaltatott egész pisztrángokat fagyasztottak le védőanyagok hozzáadása nélkül, majd 1113 napi (azaz több, mint 3 évi) szárazjégen (-79°C), illetve laboratóriumi mélyfagyasztóban (-80°C) végzett tárolás után az állatokat felolvasztották és a heréikből nagyszámú életképes spermatogóniumot izoláltak. Az izolált sejteket később megfelelő recipiensbe átültetve donortól származó spermát és ikrát nyertek és életképes ivadékot hoztak létre (Lee és mtsai, 2015). A módszer alapjaiban kérdőjelezi meg a mélyhűtési eljárások bonyolultságát.

AZ OOGÓNIMUMOK

Az oogóniumok és kisebb mértékig oociták mélyhűtésére és átültetésére kevesebb figyelem irányul, mint a PGC-kkel és a spermatogóniumokkal végzett munkára. Az oociták fejlettsége miatt az átültetésük egyelőre kis hatékonyságú, még akkor is, ha már van példa a sikeres átültetésre és a recipienstől kinyert donor-eredetű ikrából sikerült is utódokat nyerni (Csenki és mtsai, 2010). Az oogóniumok a spermatogóniumokhoz hasonlóan összejt-tulajdonságokkal rendelkeznek, ugyanakkor hím heterogaméciával szaporodó fajokban az adott faj genetikai információjának egy részét ezek a sejtek nem viszik tovább, míg a spermatogóniumok igen.

Az oogóniumokkal végzett munka (izoláció, mélyhűtés) sok szempontból hasonlít a spermatogóniumokban alkalmazott módszertanhoz. Az oogóniumok izolációja leghatékonyabban ivaréretlen halakban hajtható végre, ahol ezek a

sejtek még viszonylag nagy számban találhatók meg. A petefészek-szövet enzimikus emésztését követő egyszerű, 50 μm -es szűrőkorongon keresztül végzett sejtszűréssel a lazacfélék oogóniumai jól elkülöníthetők voltak a nagyobb átmérőjű oocitáktól (Lujic és mtsai, 2018a). Pontyban hasonló eredményességgel lehetett elkülöníteni az oogóniumokat 30 μm -es szűrőn keresztül végzett szűréssel (Lujic és mtsai, 2018b, Franěk és mtsai, 2019b).

Az oogóniumok esetében mind a rövid távú, mind a mélyhűtött tárolás jól alkalmazható. Rövid távú tároláskor a pontytól származó sejtszuspenziók egyértelműen nagyobb hatékonysággal voltak tárolhatók, mint a szövetek, amelyekben a sejtek túlélése már 6 óra után jelentősen csökkent. A sejtszuspenzióban tárolt oogóniumok 25%-a túlélte a kéthetes tárolást (egy hét után még a 70%-uk), azonban a tároláshoz használt tápoldat összetétele befolyásolta a sejtek életképességét (Lujic és mtsai, 2018b). A mélyhűtéses tárolás során mind a fagyasztásos, mind a vitrifikációs módszerek jó eredményességgel alkalmazhatók. A spermatogóniumok leírásánál már említett akupunktúrás türe húzott szövetek vitrifikációját sikerrel alkalmaztuk lazacfélékben, ahol az oogóniumok kb. 40%-a élte túl a vitrifikációt, és a minták szövettani elemzése kimutatta, hogy a petefészek a felolvasztás után megőrizte a szerkezetét (Lujic és mtsai, 2017). Angolnában (*Anguilla anguilla*) közel 84%-os túlélést találtunk a vitrifikációt követően. Ebben a fajban sikeresen vizsgáltunk különböző fagyasztási eljárásokat és a rövid távú tárolást is. A fagyasztásos kísérletek során a különböző hűtési és felolvasztási sebességek optimalizálása az oogóniumok közel 100%-ának túlélését eredményezte (Šćekić és mtsai, 2020). A ponty oogóniumainak fagyasztásakor az eredményeket alapvetően a használt védőanyag, illetve annak koncentrációja határozta meg, így a legjobb eredményeket 1,5 M DMSO használatakor kaptuk. Egyes cukoradalékok (glükóz, trehalóz) alkalmazása javította a sejtek túlélését, ami az optimális eljárással akár 65%-ot is elért (Franěk és mtsai, 2019b). Mind angolnában, mind pontyban vizsgáltuk a rövid távú tárolás lehetőségeit is. Ezekben a vizsgálatokban is az angolna oogóniumai bizonyultak ellenállóbbnak, miután 13 napi tárolás után is még 60% fölött volt az élő sejtek aránya.

A RECIPIENSEK

A különböző korai stádiumú csírasejtek átültetéséhez elengedhetetlen a megfelelő recipiens megléte. A recipiensekkel szemben több követelménynek kell érvényesülnie a sikeres transzplantációs eljárás lefolytatásához. A recipiens közeli rokonságban kell álljon a donor fajjal. Japán kutatók több elegáns tanulmányban bizonyították ennek korlátait. Vizsgálataikban azt találták, hogy ha azonos nemű (*genus-on*) belül ültettek át PGC-ket zebradánió és színjátzó dánió donorból sterilizált zebradánió recipiensbe, akkor az összes recipiens hímmé differenciált, de ösztrogénkezelés hatására ezek ivara átváltoztatható volt ikrássá. Ha azonban távolabbi rokonságban álló fajok, pl. aranyhal (azonos család, Cyprinidae) vagy mandzsucsík (azonos rend, Cypriniformes) sejtjeit ültették be, abban az esetben a recipiens zebradániók kizárólag hímmé differenciáltak és az ivarátfordítás eredménytelen volt (Saito és mtsai, 2008). Érdekes módon a PGC-k vándorlását szabályozó mechanizmus még az olyan egymástól távol álló fajokban is fennmaradt, mint a japán angolna (*Anguilla japonica*) és a zebradánió, még akkor is,

ha az angolna PGC-k átültetése gametogenezishez természetesen nem vezetett (Saito és mtsai, 2011). Saját vizsgálatainkban sebes pisztráng (*Salmo trutta m. fario*) és pénzes pér (*Thymallus thymallus*) spermatogóniumait és oogóniumait ültettük át szívárványos pisztráng recipiensekbe és az átültetés után 60 nappal a recipiens 23-28%-ában ki tudtuk mutatni a donor-eredetű csírasejteket a fejlődő ivarszervben. Hasonló módon, a ponty oogóniumai is sikerrel megtapadtak az aranyhal ivarszerveiben és 2 hónappal a transzplantáció után is jelen voltak benne (Franěk és mtsai, 2019b).

A recipiensekkel szembeni második követelmény, hogy lehetőség szerint sterilek legyenek. Erre azért van szükség, mert normálisan működő gametogenezis mellett a beültetett és általában korlátozott mennyiségű donor eredetű sejtnek a recipiens saját sejtjeivel kell versenyeznie. Halakban a sterilitást több módon is ki lehet váltani, pl. triploidizációval vagy rokon fajok keresztezésével. A triploidizáció viszonylag rutin eljárás a haltenyésztésben. Termékenyítéskor az ikrát sokkolják (hő-, hideg- vagy nyomássokk alkalmazásával), ami a második sarkítest visszatartásával triploid egyedet alakít ki (Thorgaard, 1983). Ezen egyedek növekedése gyorsabb, mint diploid fajtársaiké, gametogenezisük ugyanakkor zavart szenved, így a legtöbb esetben képtelenek a spermiációra vagy ovulációra. Okutsu és mtsai (2007) szívárványos pisztráng spermatogóniumait ültették át triploid maszu lazac (*Oncorhynchus masou*) frissen kelt lárváiba. A recipienseket felnevelve azoktól sikeresen nyertek ki a donortól származó ikrát és spermát, majd ezeket megtermékenyítve szívárványos pisztráng utódokat hoztak létre. Sikeresen használták fajazonos szívárványos pisztráng triploid lárváit is recipiensként spermatogóniumok átültetéséhez (Lee és mtsai, 2013).

A sterilitás kiváltásához pontyfélékben az eddigiektől eltérő molekuláris biológiai eljárást használtak. Zebradánióban elterjedt a PGC-k vándorlásában szabályozó szerepet játszó *dead end* (*dnd*) gén ideiglenes (*knock-down*) vagy végleges (*knock-out*) kiütése, ami a PGC-k hibás vándorlását okozza a fejlődő embrióban, így ősvarsejtek híján a kialakuló egyed steril lesz (Tzung és mtsai, 2015; Li és mtsai, 2017). Saját vizsgálatainkban az előbbi módszert használtuk, amikor a *dnd* gént ideiglenesen kiűtő antiszensz morpholino oligonukleotidokat (MOI-*dnd*) injektáltunk zebradánió 1-4 sejttes embrióiba. A kialakuló kontroll egyedek ivarszervei (heréi, mivel a zebradánió meghatározott mennyiségű PGC nélkül hímme differenciál) áttetsző, csírahámtól mentes képletekké fejlődtek. A sterilizált recipiensekbe különböző zebradánió vonalak egyedeiből izolált friss, fagyasztott és vitrifikált spermatogóniumokat ültettünk be. A felnevelt recipiensektől később a donortól származó tejet fejtünk, illetve ivattuk őket vad típusú ikrásokkal, majd molekuláris biológiai eljárásokkal is bizonyítottuk az utódok donor-eredetét (Marinović és mtsai, 2019). A fent említett MOI-*dnd* kezelést alkalmaztuk aranyhal embriók sterilizálására is, amelyekbe később ponty spermatogóniumait ültettük át. A recipiensek mintegy 40%-ában a beültetett spermatogóniumok sikeresen kolonizálták az üres ivarszervet, és az átültetés után 3 hónappal felboncolt halakban aktív spermatogenezist találtunk (Franěk és mtsai, 2019a).

Egyes fajok hibridizációja szintén steril egyedeket eredményez, amelyek sikerrel használhatók recipiensként. Az árnyékhalfélék (*Sciaenidae*) családjába tartozó *Nibea mitsukurii* és *Pennahia argentata* fajok hibridjeinek ivarszerve morfológiailag a herének felel meg, azonban hiányoznak belőle a csírasejtek. A kutatók

kiderítették, hogy a hibridekben a PGC-k vándorlása embrionális korban lezajlik, azonban ezek proliferációja elmarad. A hibrid lárvákba a *N. mitsukurii* heréiből izolált sejtszuspenziót injektáltak, majd a felnevelt recipiensek egy részétől működő és a donorral fajazonos spermát tudtak nyerni, amellyel sikeres termékenyítést végeztek. A vizsgálat során találtak ikrás hibrideket is, azonban a tejeseknél jóval kisebb arányban (43♂ és 1♀) (Yoshikawa és mtsai, 2018).

Végül érdemes még megemlíteni, hogy kifejlett egyedeket is sikerrel használtak már recipiensként, megfelelő sterilizációs kezelést követően. A nílusi tilápia (*Oreochromis niloticus*) spermatogóniumait brazil kutatók ültették át olyan kifejlett tejések heréibe, amelyeket előtte buszulfán citosztatikummal kezeltek és így szakították meg az önálló spermatogenezisüket. A kezelt halak 9 héttel a kezelést követően már ivathatók voltak és a kapott ivadék a donor fenotípusos és molekuláris jegyeit viselte (Lacerda és mtsai, 2010). Később a fent már említett *N. mitsukurii* × *P. argentata* fajhibrid kifejlett egyedeit is használták recipiensként. Az egyedek vegyszeres sterilizációjára ebben az esetben nem volt szükség, mivel azoknak eleve nem volt működő gametogenezise. Az eredmények alapján a recipiensek mintegy 10%-ában sikeresen megindult a spermatogenezis folyamata és a kinyert spermával termékenyített ikratételekből a donorral fajazonos ivadék kelt ki (Xu és mtsai, 2019). Az eredmények jelzik, hogy a transzplantáció kifejlett egyedekbe is lehetséges, még akkor is, ha lárvakorban az immunválasz kisebb valószínűséggel vezet a beültetett sejtek kilökődéséhez.

KÖVETKEZTETÉSEK

A populációk biológiai és genetikai sokféleségének megőrzése a mezőgazdaság és a természetvédelem alapvető érdeke. A sokféleség hiánya, a monokultúra előbb vagy utóbb mind a természetes, mind a tenyésztett populációk hanyatlásához vezet. Ennek érdekében a kutatók folyamatosan dolgoznak újabb módszereken, amelyek lehetővé teszik ennek a sokféleségnek a megővését.

A halak ősvarsejtjeinek izolációja, mélyhűtése és átültetése új lehetőséget nyitott a génmegőrzés számára. A spermiumokkal szemben ezek a sejtek diploidok, hordozzák és továbbadják egy faj teljes genetikai hátterét (nukleáris és mitokondriális DNS-ét) és mélyhűtött állapotban évekig, évtizedekig tárolhatók, majd felhasználhatók. Kétségtelen, hogy a módszer felhasználási lehetőségei rendkívül széles körűek mind természetvédelmi (fajmegőrzési), mint állattenyésztési területen. A tudomány egy újabb eszközt bocsátott a gyakorlat rendelkezésére, így már a szakmától függ annak felhasználása.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szemleciikk alapjául szolgáló saját kutatást az Emberi Erőforrások Minisztériuma által meghirdetett Felsőoktatási Intézményi Kiválósági Program (1783-3/2018/FEKUTSRAT) támogatta, a Szent István Egyetem vízzel kapcsolatos kutatások tématerületi programja keretében, illetve a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH) az FK124585 és K129127 projektek révén.

IRODALOMJEGYZÉK

- Csenki, Z. – Zaucker, A. – Kovács, B. – Hadzhiev, Y. – Hegyi, R. – 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. *Int. J. Dev. Biol.*, 54. 585–589.
- Franěk, R. – Marinović, Z. – Lujić, J. – Urbányi, B. – Fučíková, M. – Kašpar, V. – Pšenička, M. – Horváth, Á. (2019a): Cryopreservation and transplantation of common carp spermatogonia. *PLoS One*, 14. e0205481.
- Franěk, R. – Tichopád, T. – Steinbach, C. – Xie, X. – Lujić, J. – Marinović, Z. – Horváth, Á. – Kašpar, V. – Pšenička, M. (2019b): Preservation of female genetic resources of common carp through oogonial stem cell manipulation. *Cryobiology*, 87. 78–85.
- Higaki, S. – Mochizuki, K. – Akashi, Y. – Yamaha, E. – Seiji, K. – Takahashi, Y. (2010a): Cryopreservation of primordial germ cells by rapid cooling of whole zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *J. Reprod. Dev.*, 56. 212–218.
- Higaki, S. – Eto, Y. – Kawakami, Y. – Yamaha, E. – Kagawa, N. – Kuwayama, M. – Nagano, M. – Katagiri, S. – Takahashi, Y. (2010b): Production of fertile zebrafish (*Danio rerio*) possessing germ cells (gametes) originated from primordial germ cells recovered from vitrified embryos. *Reproduction*, 139. 733–740.
- Higaki, S. – Kawakami, Y. – Eto, Y. – Yamaha, E. – Nagano, M. – Katagiri, S. – Takada, T. – Takahashi, Y. (2013): Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. *Cryobiology*, 67. 374–382.
- Inoue, D. – Fujimoto, T. – Kawakami, Y. – Yasui, G. S. – Yamaha, E. – Arai, K. (2012): Vitrification of primordial germ cells using whole embryos for gene-banking in loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. *J. Appl. Ichthyol.*, 28. 919–924.
- Iwasaki-Takahashi, Y. – Shikina, S. – Watanabe, M. – Banba, A. – Yagisawa, M. – Takahashi, K. – Fujihara, R. – Okabe, T. – Valdez Jr, D. M. – Yamauchi, A. – Yoshizaki, G. (2020): Production of functional eggs and sperm from in vitro-expanded type A spermatogonia in rainbow trout. *Commun. Biol.*, 3. 308.
- Kobayashi, T. – Takeuchi, Y. – Yoshizaki, G. – Takeuchi, T. (2003): Cryopreservation of trout primordial germ cells. *Fish Physiol. Biochem.*, 28. 479–480.
- Kobayashi, T. – Takeuchi, Y. – Takeuchi, T. – Yoshizaki, G. (2007): Generation of viable fish from cryopreserved primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.*, 74. 207–213.
- Lacerda, S. M. S. N. – Batlouni, S. R. – Costa, G. M. J. – Segatelli, T. M. – Quirino, B. R. – Queiroz, B. M. – Kalapothakis, E. – França, L. R. (2010): A new and fast technique to generate offspring after germ cells transplantation in adult fish: The Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *PLoS One*, 5. e10740.
- Lacerda, S. M. dos S. N. – Costa, G. M. J. – de França, L. R. (2014): Biology and identity of fish spermatogonial stem cell. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 207. 56–65.
- Lee, S. – Iwasaki, Y. – Shikina, S. – Yoshizaki, G. (2013): Generation of functional eggs and sperm from cryopreserved whole testes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110. 1640–1645.
- Lee, S. – Seki, S. – Katayama, N. – Yoshizaki, G. (2015): Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. *Sci. Rep.*, 5. 16045.
- Li, Q. – Fujii, W. – Naito, K. – Yoshizaki, G. (2017): Application of dead end - knockout zebrafish as recipients of germ cell transplantation. *Mol. Reprod. Dev.*, 84. 1100–1111.
- Lin, F. – Liu, Q. – Li, M. – Li, Z. – Hong, N. – Li, J. – Hong, Y. (2012): Transient and stable GFP expression in germ cells by the vasa regulatory sequences from the red seabream (*Pagrus major*). *Int. J. Biol. Sci.*, 8. 882–890.
- Lujić, J. – Marinović, Z. – Sušnik Bajec, S. – Djurdjević, I. – Kása, E. – Urbányi, B. – Horváth, Á. (2017): First successful vitrification of salmonid ovarian tissue. *Cryobiology*, 76. 154–157.

- Lujić, J. – Marinović, Z. – Sušnik Bajec, S. – Djurdjević, I. – Urbányi, B. – Horváth, Á. (2018a): Interspecific germ cell transplantation: a new light in the conservation of valuable Balkan trout genetic resources? *Fish Physiol. Biochem.*, 44. 1487–1498.
- Lujić, J. – Marinović, Z. – Kása, E. – Ščekić, I. – Urbányi, B. – Horváth, Á. (2018b): Preservation of common carp germ cells under hypothermic conditions: Whole tissue vs isolated cells. *Reprod. Domest. Anim.*, 53. 1253–1258.
- Marinović, Z. – Lujić, J. – Kása, E. – Bernáth, G. – Urbányi, B. – Horváth, Á. (2017): Cryosurvival of isolated testicular cells and testicular tissue of tench *Tinca tinca* and goldfish *Carassius auratus* following slow-rate freezing. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 245. 77–83.
- Marinović, Z. – Lujić, J. – Kása, E. – Csenki, Z. – Urbányi, B. – Horváth, Á. (2018): Cryopreservation of zebrafish spermatogonia by whole testes needle immersed ultra-rapid cooling. *J. Vis. Exp.*, 133. e56118.
- Marinović, Z. – Li, Q. – Lujić, J. – Iwasaki, Y. – Csenki, Z. – Urbányi, B. – Yoshizaki, G. – Horváth, Á. (2019): Preservation of zebrafish genetic resources through testis cryopreservation and spermatogonia transplantation. *Sci. Rep.*, 9. 13861.
- Martínez-Páramo, S. – Horváth, Á. – Labbé, C. – Zhang, T. – Robles, V. – Herráez, P. – Suquet, M. – Adams, S. – Viveiros, A. – Tiersch, T.R. – Cabrita, E. (2017): Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture*, 472. 156–177.
- Okutsu, T. – Shikina, S. – Kanno, M. – Takeuchi, Y. – Yoshizaki, G. (2007): Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*, 317. 1517–1517.
- Pšenička, M. – Saito, T. – Linhartová, Z. – Gazo, I. (2015): Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. *Theriogenology*, 83. 1085–1092.
- Robles, V. – Riesco, M. F. – Psenicka, M. – Saito, T. – Valcarce, D.G. – Cabrita, E. – Herráez, P. (2017): Biology of teleost primordial germ cells (PGCs) and spermatogonia: Biotechnological applications. *Aquaculture*, 472. 4–20.
- Saito, T. – Fujimoto, T. – Maegawa, S. – Inoue, K. – Tanaka, M. – Arai, K. – Yamaha, E. (2006): Visualization of primordial germ cells *in vivo* using GFP-nos1 3' UTR mRNA. *Int. J. Dev. Biol.*, 50. 691–700.
- Saito, T. – Goto-Kazeto, R. – Arai, K. – Yamaha, E. (2008): Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol. Reprod.*, 78. 159–166.
- Saito, T. – Goto-Kazeto, R. – Kawakami, Y. – Nomura, K. – Tanaka, H. – Adachi, S. – Arai, K. – Yamaha, E. (2011): The mechanism for primordial germ-cell migration is conserved between Japanese eel and zebrafish. *PLoS One*, 6. e24460.
- Schulz, R. W. – de França, L. R. – Lareyre, J.-J. – LeGac, F. – Chiarini-Garcia, H. – Norega, R. H. – Miura, T. – Nobrega, R. H. – Miura, T. (2010): Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165. 390–411.
- Ščekić, I. – Marinović, Z. – Lujić, J. – Müller, T. – Kitanović, N. – Urbányi, B. – Horváth, Á. (2020): A novel strategy for conservation of European eel (*Anguilla anguilla*) genetic resources: Cryopreservation of ovarian stem cells. *Cryobiology*, 95. 151–156.
- Takeuchi, Y. – Yoshizaki, G. – Kobayashi, T. – Takeuchi, T. (2002): Mass isolation of primordial germ cells from transgenic rainbow trout carrying the green fluorescent protein gene driven by the vasa gene promoter. *Biol. Reprod.*, 67. 1087–1092.
- Takeuchi, Y. – Yoshizaki, G. – Takeuchi, T. (2004): Surrogate broodstock produces salmonids. *Nature*, 430. 629–630.
- Thorgaard, G. H. (1983): Chromosome set manipulation and sex control in fish, in: Hoar, W. – Randall, D. J. – Donaldson, E. M. (Eds.), *Fish Physiology*. Academic Press, New York, 405–434.
- Tiersch, T. R. (2011): Introduction to the Second Edition, in: Tiersch, T. R. – Green, C. C. (Eds.), *Cryopreservation in Aquatic Species*, 2nd Edition. World Aquaculture Society, Baton Rouge, 1–17.

- Tzung, K. W. – Goto, R. – Saju, J. M. – Sreenivasan, R. – Saito, T. – Arai, K. – Yamaha, E. – Hossain, M. S. – Calvert, M. E. K. – Orbán, L. (2015): Early depletion of primordial germ cells in zebrafish promotes testis formation. *Stem Cell Reports*, 4. 61–73.
- Xu, D. – Yoshino, T. – Konishi, J. – Yoshikawa, H. – Ino, Y. – Yazawa, R. – dos Santos Nassif Lacerda, S. M. – de França, L. R. – Takeuchi, Y. (2019): Germ cell-less hybrid fish: ideal recipient for spermatogonial transplantation for the rapid production of donor-derived sperm. *Biol. Reprod.*, 101. 492–500.
- Yoshikawa, H. – Xu, D. – Ino, Y. – Yoshino, T. – Hayashida, T. – Wang, J. – Yazawa, R. – Yoshizaki, G. – Takeuchi, Y. (2018): Hybrid sterility in fish caused by mitotic arrest of primordial germ cells. *Genetics*, 209. 507–521.
- Yoshizaki, G. – Takeuchi, Y. – Sakatani, S. – Takeuchi, T. (2000): Germ cell-specific expression of green fluorescent protein in transgenic rainbow trout under control of the rainbow trout vasa-like gene promoter. *Int. J. Dev. Biol.*, 44. 323–326.
- Yoshizaki, G. – Takeuchi, Y. – Tominaga, H. – Kobayashi, T. – Takeuchi, T. (2002): Visualization of primordial germ cells in transgenic rainbow trout carrying green fluorescent protein gene driven by vasa promoter. *Fish. Sci.*, 68. 1067–1070.
- Yoshizaki, G. – Takeuchi, Y. – Kobayashi, T. – Ihara, S. – Takeuchi, T. (2002): Primordial germ cells: The blueprint for a piscine life. *Fish Physiol. Biochem.*, 26. 3–12.
- Yoshizaki, G. – Takeuchi, Y. – Kobayashi, T. – Takeuchi, T. (2003): Primordial germ cell: A novel tool for fish bioengineering. *Fish Physiol. Biochem.*, 28. 453–457.
- Yoshizaki, G. – Fujinuma, K. – Iwasaki, Y. – Okutsu, T. – Shikina, S. – Yazawa, R. – Takeuchi, Y. (2011): Spermatogonial transplantation in fish: A novel method for the preservation of genetic resources. *Comp. Biochem. Physiol. Part D, Genomics Proteomics*, 6. 55–61.

Érkezett: 2020. június

Szerzők címe: Horváth Á. – Marinović Z. – Kitanović N. – Šćekić I. – Urbányi B.
Magyar Agrár és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Akvakultúra és Környezetbiztonsági Intézet, Halgazdálkodási Tanszék

Authors' address: Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Szent István Campus, Institute of Aquaculture and Environment Safety, Department of Aquaculture H-2100 Gödöllő, Páter Károly u. 1.
Horvath.Akos@szie.hu

Lujić J.

Department of Biomedical Sciences, Department of Biomedical Sciences, Cohen Lab VRT - T9 006, Cornell University
Ithaca, NY 14853, USA

Hoitsy Gy.

Lillafüredi Pisztrángtelep, Hoitsy és Rieger Kft.
Lillafüred Trout Farm, Hoitsy and Rieger Ltd.
H-3517 Miskolc, Erzsébet stny. 55.