

Animal welfare, etológia és tartástechnológia



Animal welfare, ethology and housing systems

Volume 19

Issue 1

Gödöllő
2023

EMBRIONÁLIS GONÁDBÓL SZÁRMAZÓ SEJTSZUSZPENZIÓK BEÉPÜLÉSÉNEK VIZSGÁLATA MAGYAR PARLAGI GYÖNGYTYÚKBAN

*Ecker András^{1,2}, Lázár Bence^{1,2,3}, Tóth Roland^{1,2}, Várkonyi Eszter³,
Gócza Elen^{1,2}*

¹Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet,
Állatbiotechnológia Tanszék

2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert utca 4.

²Agrár-biotechnológia és precíziós nemesítés az élelmiszerbiztonságért Nemzeti Laboratórium
2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert utca 4.

³Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ, Haszonállat-génmegőrzési Intézet
2100 Gödöllő, Isaszegi út 200.
ecker.andras@phd.uni-mate.hu

Received – Érkezett: 20.11.2022.

Accepted – Elfogadva: 03.04.2023.

Összefoglalás

A jelenkor állattenyésztési tendenciái mellett egyre nagyobb hangsúlyt kap a termelésből kiszoruló fajták génmegőrzése. Míg emlősök esetében már jól megoldott technológiák állnak rendelkezésünkre, madaraknál problémákat okoz a hímek (ZZ) homogamétás jellege, hiszen a hímivarsejt mélyhűtése nem biztosítja mindkét ivari kromoszóma megőrzését. Ezen probléma megoldása érdekében új módszerek kifejlesztésére van szükség. Kísérletünkben az izolált 10 napos magyar parlagi parlagi gyöngytyúk embrionális gonádokat emésztettük és sejtszuszpenziót készítettünk belőlük. Ez a szuszpenzió egyebek mellett tartalmazta az ivarsejtek prekursorait, az ősvarsejteket (primordial germ cell, PGC) is. A sejteket PKH26 piros fluorescens festékkel jelöltük, majd injektáltuk őket 3 napos embriók véráramába. Négy nappal később a 7 napos embriókat felbontottuk, izoláltuk a gonádjaikat és sztereomikroszkóp alatt megvizsgáltuk a beépülést a festett sejtek jelenléte alapján. Eredményeink azt mutatták, hogy kilenc sikeres injektálásból három esetben sejtbeépülés történt. Ezek közül két esetben női ivarú, egy esetben hím ivarú sejtszuszpenziót injektáltunk. A továbbiakban szeretnénk bevonni a kísérletbe egy mélyhűtési lépést, így vizsgálva az embrionális gonádsejt-szuszpenziók injektálásának potenciálját a génmegőrzés terén.

Kulcsszavak: magyar parlagi gyöngytyúk, génmegőrzés, PGC, gonád

Examination of embryonic gonadal cell suspension integration in Hungarian landrace guinea fowl

Abstract

The present tendencies in animal husbandry put more and more emphasis on the gene preservation of the breeds excluded from production. While the mammalian species already have reliable methods for this, avians are problematic due to the homogametic nature of the male (ZZ) animals. To solve this problem the development of new technologies is necessary. In our experiment 10-day-old Hungarian landrace guinea fowl embryonic gonads were isolated and digested to create a cell suspension. This suspension contained various cell types, including primordial germ cells or PGCs. We marked the cells with the PKH26 red fluorescent stainer and injected them into the circulation of 3-day-old embryos. After four days we dissected the gonads from the 7-day-old embryos and examined the integration under stereo microscope according to the presence of stained cells. Our results showed that out of nine successful injections in three cases there were integrated stained cells in the gonads. Out of these in two cases female cells, in one case male cells were injected into the embryo. Our future goal is to include a freezing step into the experiment so we could check the potential of embryonic gonadal cell suspension injection in gene preservation.

Keywords: Hungarian landrace guinea fowl, gene preservation, PGC, gonad

Irodalmi áttekintés

Az *in vitro* génbankok terén többféle lehetőség áll rendelkezésünkre, attól függően, hogy az egyedek mely sejtjének raktározása a cél (*Petitte és mtsai, 2004; Petite, 2006; Barna és mtsai, 2016; Szalay, 2017*). Ezek az eljárások a genetikai információ megőrzésére törekuszenek, aminek konszenzusosan leginkább elfogadott módja a mélyhűtés, hiszen ily módon az örökítőanyagot hosszú távon, kisebb költséggel, mobilisan lehet prezerválni (*Liu és mtsai, 2013*). Azonban azt is figyelembe kell venni, hogy a génmegőrzéshez olyan sejtekre van szükségünk, amelyekből a lehető leggyorsabban, a lehető legjobb határfokkal reprodukálni lehet a megőrzendő faj egyedeit, ebből a perspektívából pedig a mélyhűtés problémákat vet fel.

Globálisan az egyik leginkább alkalmazott és ezzel együtt legjobban kidolgozott módszer a génbankok létrehozására a spermamélyhűtés. A spermiumot az teszi ideálissá ezen felhasználásra, hogy nagy mennyiségben kinyerhető az egyedekből az állat egészségének kockáztatása nélkül. Maga a sejt kis víztartalommal bír, így viszonylag jól fagyasztható. Több emlősfajnál napjainkban már jól kidolgozott technológiák szerint, jó határfokkal történik a spermamélyhűtés (*Ugur és mtsai, 2019; Yánez-Ortiz és mtsai, 2022*).

Madarak esetében a szaporító szervrendszer kialakulása (*Tóth és mtsai, 2018*) és sajátosságai nagymértékben eltérnek az emlősökétől, így sajnálatos módon nem a hímivarsejt mélyhűtése a leoptimálisabb lehetőség. Ennek fő oka az, hogy míg az emlősökben a női ivarkromoszómapár azonos (XX), a hímé pedig eltérő (XY), addig a madaraknál ez fordítottan (hím: ZZ, női ivar: ZW) működik, ezért a spermium fagyasztása során nem konzerválódik a W-kromoszóma. Ettől függetlenül a hímivarsejt mélyhűtése továbbra is fontos technológia a madarak génmegőrzésének területén is.

Opcióként megemlíthető a petesejt mélyhűtése is, azonban ez a technológia komoly akadályokba ütközik. A madár petesejt, vagyis a tojás, a legnagyobb méretű női ivarsejt, ezzel

együtt nagyon magas víz-, és fehérjetartalommal bír, ami ellehetetleníti a mélyhűtést. Ennek következtében más technológiát célszerű alkalmazni.

Emlősöknél lehetőség van a megtermékenyített petesejt fagyasztására, madaraknál azonban sokkal inkább az embrióból származó őssejteket, például ősvarsejteket (primordial germ cell, PGC) (Setioko és mtsai, 2007; Nakamura, 2016; Woodcock és mtsai, 2019; Divya és mtsai, 2021; Lázár és mtsai, 2021), illetve a napos kori csibéből vagy az embrióból kiműtött hím vagy nő ivarszervet szokták felhasználni a génmegőrzéshez (Silversides és mtsai, 2013). Az ősvarsejtek felhasználása, bár mindenképp ígéretes, jelentős fejlesztéseket igényel, ugyanis a sejtek tenyésztő médiuma egyelőre túlzottan specifikus, így minden faj esetén új médiumot szükséges fejleszteni. Ezzel szemben a teljes gonád mélyhűtése esetén nincs szükség a sejtenyésztési lépésre, így univerzálisabban használható technológia. Mindkét módszer alkalmas lehet arra, hogy egy másik fajtaból származó állatba beültetve a sejteket, azok a recipiens szervezetbe integrálódjanak, és ott a donor fajra jellemző spermiumot, illetve petesejteket kezdjenek termelni. Ha ezeket a spermiumokat/petesejteket a donor fajból származó ivarsejttel megtermékenyítjük, már az első generációban 100%-os sikerrátával visszanyerhetjük az eredeti genotípust (Szalay, 2017).

Az általunk tesztelt módszer az embrionális gonádokból emésztés útján kapott sejtszuszpenzió génbanki felhasználásának lehetősége volt, amit már sikeresen teszteltek házi tyúk embriók felhasználásával (Tiambo és mtsai., 2021; Hu és mtsai, 2022). Az itt dokumentált kísérlet volt az első, ami a magyar parlagi gyöngytyúkban próbálta reprodukálni ezt az eredményt. Célunk az izolált magyar parlagi gyöngytyúk gonádsejt-tenyészetek festése és injektálása volt recipiens embrióba, majd ezen sejtek beépülésének vizsgálata a fluoreszcencia jelenléte alapján.

Anyag és módszer

Kísérletünkhöz a gödöllői Haszonállat-génmegőrzési Intézetből származó magyar parlagi gyöngytyúk tojásokat használtunk fel. A tojásokat a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetemen levő Genetika és Biotechnológia Intézet Alkalmazott Embriológia és Őssejtbiológia csoportjának laboratóriumában található keltetőben inkubáltuk 37,8 °C hőmérsékleten és 70% páratartalom mellett tíz napig. A motorizált keltetőben a tojások az inkubáció teljes ideje alatt forgatva voltak, hogy elkerüljük az embrió letapadását. A tizedik napon az alkohollal fertőtlenített tojásokat felbontottuk és mikroszkóp alatt izoláltuk az embriók gonádját. A gonádokat nemenként külön 1,5 ml-es csövekben levő 2:1 arányú DMEM:víz (Gibco) keverékbe gyűjtöttük. Az embriók ivarának meghatározását arra alapoztuk, hogy ebben az embrionális fejlődési stádiumban a hímek jobb ivarszervének visszafejlődése már megkezdődött, így asszimmetrikus gonádpárral rendelkeztek, ami segítette a nemek elkülönítését.

A leggyűjtött gonádokat 0,25% Tripszin-EDTA oldatban emésztettük 37°C hőmérsékleten inkubálva, 700 rpm-es rázatást alkalmazva. 10 percenként szuszpendálva az egyre lazább gonádokat, ezt ismételtük addig, amíg az emésztés sikeresen szétbontotta a szöveteket. Mikor ezt elértük, ősvarsejt tenyésztőmédiummal (DMEM kalcium nélkül (Gibco, 21068-028), szövettenyésztéshez használt víz (Gibco, A12873-01), piruvát (Gibco, 11360039), MEM vitamin oldat (Gibco, 11120052), MEM aminosavak (Sigma, M5550), B27 (Gibco 17504044), glutamax (Gibco, 35050038), nem esszenciális aminosavak (Gibco, 11140035), nukleozidok (EmbryoMax, ES-008-D), B-merkaptoetanol (Gibco, 31350010), CaCl₂ (Sigma, C4901-100G), ovalbumin (Sigma, A5503), heparin (Sigma, H3149-25KU), Penicilin-Sztreptomycin (Gibco, 15070-063), házi tyúk szérum (Sigma, C5405), humán aktivin (Invitrogen, PHC9564), bFGF (Gibco, 13256-029), ovotranszferin (Sigma, C7786)(Whyte et al., 2015) leállítottuk az emésztést. 40 µm

lyukátmérőjű szűrőn szűrtük át a szuszpenziót, majd centrifugával üleptítettük és DPBS-ben (Gibco) szuszpendáltuk fel a sejteket.

Az így kapott sejtoldatból centrifugával (2000 rpm, 20°C, 4 min) pelletet készítettünk, majd felsuszpendáltuk a sejtfestésnél használt Diluent C pufferbe. Hozzáadtuk a PKH26 piros fluoreszcens sejtfestéket és fénytől védve 2 percig folyamatos szuszpendálás mellett inkubáltuk. Ennek lejártaival a festést ősvarsejt tenyésztőmediummal állítottuk le. Sejtszámolást végeztünk a NanoEntek Arthur Fluorescent Cell Counter (NanoEntek, Dél-Korea) sejtszámolóval, hogy ellenőrizzük a festés sikerességét, valamint beállítsuk az optimális (5000 sejt/ μ l) sejtkoncentrációt az injektáláshoz.

Miután kialakítottuk a megfelelő sejtuszuszpenziót, három napig inkubált tojások héján kb. 1,5 cm x 1,5 cm nagyságú ablakot nyitottunk csipesszel úgy, hogy ráláthassunk a Hamburger-Hamilton 16. stádiumú embrióra (*Hamburger és Hamilton, 1951*) (1. ábra). Szájpipettára erősített kihegyezett üvegapilláris segítségével nagyjából 2 μ l szuszpenziót juttattunk az embrió véráramába, majd sterilizált parafilmlel lezártuk a tojásokat és visszatettük őket a keltetőbe további keltetésre.

1. ábra: HH16 stádiumú Magyar parlagi gyöngytyúk embrió a sejtinjektálás előtt



Figure 1: HH16 Hungarian landrace guinea fowl embryo before cell injection

A PKH26 festék a sejtosztódás során a citoplazmával együtt oszlik tovább az utódsejtekbe, így bizonyos sejtosztódási ciklus után (4-5) kihígul és detektálhatatlanná válik. A festést követően 4. napon (7,5 napos embriókban) még látható a festés, így vizsgálható a donoreredetű sejtek beépülése az ivarszervekbe a PKH26-expresszió jelenléte alapján. A vizsgálatot Leica DFC 7000T (Leica, Németország) sztereómikroszkóp alatt végeztük.

Eredmények és értékelésük

Eredményeinket a sztereómikroszkópos elemzés során készült fotókkal szemléltetjük. Az injektálások során célunk volt mindkét nemhez tartozó sejtuszpenzió használata. A 24 tojásba 18 injektálást végeztünk, ezekből 9 embrió fejlődött tovább a 7. napig. A PKH26 jelölt sejtek jelenléte alapján 3 embrió gonádjai tartalmaztak donoreredetű sejteket. Ezek az 1., 2. és 6. injektálási sorszámú egyedek voltak.

A sikeres injektálásokból egy alkalommal hímivarú (1), míg két esetben nőivarú (2,6) gonádokból származó sejtkeveréket használtunk. Mindhárom esetben jól láthatóak a gonádban és a gonád körül a piros fluoreszcenciát mutató PKH26-jelölt sejtek (2.-3. ábra).

2. ábra: Magyar parlagi gyöngytyúk gonád (1.) hímeredetű PKH26 piros fluoreszcens festékekkel jelölt ősvarsejtekkel

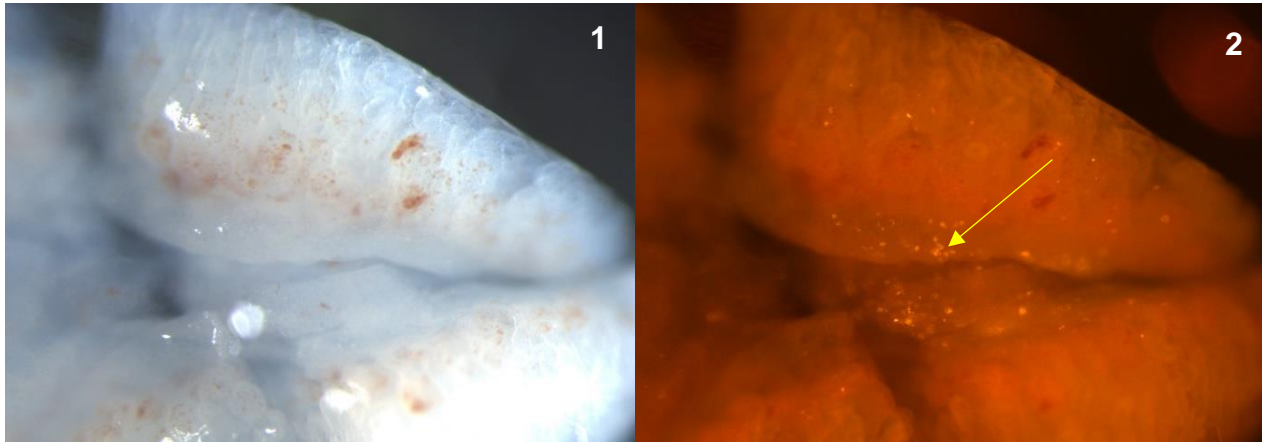


Figure 2: Hungarian landrace guinea fowl gonad (1.) with male donor-derived PKH26 marked red fluorescent PGCs

3. ábra: Magyar parlagi gyöngytyúk gonád (2., 6.) tojóeredetű PKH26 piros fluoreszcens festékkel jelölt ősvarsejtekkel



Figure 3: Hungarian landrace guinea fowl gonad (2., 6.) with male donor-derived PKH26 marked red fluorescent PGCs

A sejtek jelenléte a gonádon kívül feltételezéseink szerint annak köszönhető, hogy a 7. napon a PGC-k még nem léptek be maradéktalanul az ivarlécbe, így némelyikük még a szövetekben futó vérerekben található.

Mindent összevetve sikerült reprodukálni a *Tiambo és mtsai (2021)* és *Hu és mtsai (2022)* által leírt technológia sikerességét magyar parlagi gyöngytyúk esetén is. Mindkét említett munka magában foglalt egy mélyhűtési lépést is, melynek során az izolált gonádokat egészben mélyhűtötték. Megfigyeléseik szerint a 8-10 napos embriókból származó gonádsejtek jobban beépültek a recipiens gonádokba, mint a 11 napos embriókból származók. Az általunk javasolt 10 napos embrióból történő gonádlegyűjtés párhuzamos ezzel a megfigyeléssel, ugyanis a magyar parlagi gyöngytyúk hosszabb kelési idejének köszönhetően a 10 napos gyöngytyúk embrió nagyjából a 8-9 napos házi tyúk embrióval megegyező fejlődési stádiumban van. Az injektálás sikerességét nézve kísérletünk 16,7%-os rátával bírt, ami összeegyeztethető az alapul vett cikk 11-21%-os injektálási rátájával (*Tiambo és mtsai, 2021; Hu és mtsai, 2022*).

Következtetések és javaslatok

A kísérletben elvégzett vizsgálatok alapján a következő eredményeket és irányelveket fogalmazhatjuk meg a további munkára vonatkozóan:

- Eredményeink bizonyítják, hogy a bemutatott technológia használható magyar parlagi gyöngytyúk esetén is ivarszervi kimérák előállítására.
- A kísérletet érdemes lehet megismételni úgy, hogy az embriókat későbbi fejlődési stádiumban tudjuk vizsgálni (8-9. nap), ezzel vizsgálva az ösivarsejtek migrációjának sebességét és hatékonyságát.
- A távlati cél egy működőképes gonádmélyhűtési lépés beiktatása lenne a procedúrába, ezzel kihasználva a technológia nyújtotta génmegőrzési potenciált.

Irodalomjegyzék

- Barna, J., Liptói, K., Barna, E., Liptói, K., Patakiné Várkonyi, E. (2016): Save what can be saved- new possibilities in in vitro gene preservation of poultry species. Literature review. Magyar Allatorvosok Lapja, 138. 621–630.
- Divya, D., Shukla, R., Chatterjee, R., Sagar, G., Rajendra Prasad, A., Bhattacharya, T. (2021): Production of Transgenic Chimeric Chicken from Cryopreserved Primordial Germ Cells and its Validation by Developing shRNA Transgenic Chicken Chimera. *Research Square*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-275932/v1>
- Hamburger, V., Hamilton, H. L. (1951): A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, 88. 3. 49–92.
- Hu, T., Taylor, L., Sherman, A., Tiambo, C. K., Kemp, S. J., Whitelaw, B., Hawken, R. J., Djikeng, A., és McGrew, M. J. (2022): A low-tech, cost-effective and efficient method for safeguarding genetic diversity by direct cryopreservation of poultry embryonic reproductive cells. *ELife*, 11. <https://doi.org/10.7554/eLife.74036>
- Lázár, B., Molnár, M., Sztán, N., Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Tokodyné Szabadi, N., McGrew, M. J., Gócza, E., Patakiné Várkonyi, E. (2021): Successful cryopreservation and regeneration of a partridge colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. *Poultry Science*, 100. 8. 101207. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101207>
- Liu, J., Cheng, K. M., Silversides, F. G. (2013): Fundamental principles of cryobiology and application to ex situ conservation of avian species. *Avian Biology Research*, 6. 3. 187–197. <https://doi.org/10.3184/175815513X13740778695007>
- Nakamura, Y. (2016): Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells. *Journal of Reproduction and Development*, 431–437.
- Petitte, J. N. (2006): Avian germplasm preservation: Embryonic stem cells or primordial germ cells? *Poultry Science*, 85. 2. 237–242. <https://doi.org/10.1093/ps/85.2.237>
- Petitte, J. N., Liu, G., Yang, Z. (2004): Avian pluripotent stem cells. *Mechanisms of Development*, 121, 9. 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2004.05.003>
- Setioko, A. R., Tagami, T., Tase, H., Nakamura, Y., Takeda, K., Nirasawa, K. (2007): Cryopreservation of premordial germ cells (PGCs) from White Leghorn embryos using commercial cryoprotectants. *The Journal of Poultry Science*, 44. 73–77.

- Silversides, F. G., Robertson, M. C., Liu, J.* (2013): Cryoconservation of avian gonads in Canada. *Poultry Science*, 92. 10. 2613–2617. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03185>
- Szalay, I.* (2017): Génbanki kutatások régi használlataink védelmében (Szalay István, Wensky Ágnes, Eds.). Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó.
- Tiambo, C. K., Kibui, P. W., Kamidi, C., Muteti, C., Hu, T., Kemp, S., Mcgrew, M.* (2021): Laboratory training manual on biobanking and recovery of indigenous poultry genetic resources by cryopreservation of primordial germ cells (PGCs).
- Tóth, R., Lázár, B., Góczy, E.* (2018): A házityúk-ivarszerv kialakulásának érdekességei. *Természet Világa*, 149. 11.
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A., Memili, E.* (2019): Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00268>
- Whyte, J., Glover, J. D., Woodcock, M., Brzeszczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., Kaiser, P., McGrew, M. J.* (2015): FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports*, 5. 1–12.
- Woodcock, M. E., Gheyas, A. A., Mason, A. S., Nandi, S., Taylor, L., Sherman, A., Smith, J., Burt, D. W., Hawken, R., McGrew, M. J.* (2019): Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116. 42. 20930–20937. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906316116>
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J., Yeste, M.* (2022): Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science*, 246. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2021.106904>