

**Jihočeská universita v Českých Budějovicích**

**Fakulta rybářství a ochrany vod**

**Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

**Bakalářská práce**

**Záchrana kriticky ohrožených druhů ryb pomocí manipulace  
se spermatogoniemi a oogoniemi**

**Autor:** Petr Dobrovolný

**Vedoucí bakalářské práce:** Ing. Martin Pšenička, Ph.D.

**Konzultantka bakalářské práce:** Ing. Zuzana Linhartová

**Studijní program a obor:** B4103 Zootechnika, Rybářství

**Forma studia:** kombinovaná

**Ročník:** 4.

České Budějovice 2015

## **Prohlášení:**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury. Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou universitou v Českých Budějovicích na jejich internetových stránkách a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz, provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 20. 5. 2015

.....

Petr Dobrovolný

## **Poděkování:**

Na prvním místě bych rád poděkoval svému školiteli Ing. Martinu Pšeničkovi Ph.D. za nesmírnou trpělivost, za cenné a podnětné rady při praktickém provedení a při psaní bakalářské práce. Dále bych rád poděkoval své konzultantce Ing. Zuzaně Linhartové za vedení při praktické části práce. Dále bych chtěl poděkovat své přítelkyni Jarmile Michálkové za velkou pomoc s formální a jazykovou stránkou práce a za velkou psychickou podporu. Také bych chtěl poděkovat Janu Fialovi a Zdeňku Ipserovi za pomoc s formátováním této práce a rodině a přátelům za poskytnuté zázemí a podporu.

**ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**  
(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Petr DOBROVOLNÝ**  
Osobní číslo: **V11B004P**  
Studijní program: **B4103 Zootechnika**  
Studijní obor: **Rybářství**  
Název tématu: **Záchrana kriticky ohrožených druhů ryb pomocí manipulace se spermatogoniemi a oogoniemi**  
Zadávací katedra: **Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický**

**Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :**

Spermatogonie a oogonie typu A jsou zárodečné kmenové buňky specializované pro tvorbu gamet, tedy spermií a vajíček. Tyto buňky je možné izolovat z juvenilních gonád, případně rozmnožovat ve formě tkáňové kultury, a transplantovat do recipienta stejného nebo příbuzného druhu ryby. Recipient po začlenění těchto buněk do gonád pak v dospělosti produkuje gamety donora. Takový organismus potom označujeme termínem chiméra zárodečné linie (germ-line chimera).

Prvním a hlavním požadavkem pro zvládnutí techniky transplantace spermatogonií a oogonií je zvládnutí metody izolace těchto buněk. Izolované buňky se poté značí fluorescentem, kvůli jejich sledování v recipientovi po transplantaci. Buňky můžeme transplantovat mikroinjikací do larvy nebo injikací do gonád juvenila či dospělce např. přes pohlavní papilu.

Tato technika může být použita pro kryokonzervaci a záchranu ohrožených nebo vzácných druhů ryb, jejichž spermatogonie nebo oogonie můžeme transplantovat do příbuzných, ale běžnějších druhů ryb.

Cílem této práce bude popis izolace zárodečných kmenových buněk a jejich transplantace do recipienta.

## Příloha zadání bakalářské práce

### Seznam odborné literatury:

- Brinster, R. L., Zimmermann, J. W., 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(24):11298-11302
- de Rooij, D. G., Okabe, M., Nishimune, Y., 1999. Arrest of spermatogonial differentiation in jsd/jsd, Sl17H/Sl17H, and cryptorchid mice. *Biol Reprod* 61(3):842-7
- Kawasaki, T., Saito, K., Shinya, M., Olsen, L. C., Sakai, N., 2010. Regeneration of Spermatogenesis and Production of Functional Sperm by Grafting of Testicular Cell Aggregates in Zebrafish (*Danio rerio*). *Biology of Reproduction* 83(4):533-539
- Lacerda, S., Batlouni, S. R., Assis, L. H., Resende, F. M., Campos-Silva, S. M., Campos-Silva, R., Segatelli, T. M., Franca, L. R., 2008. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cybium* 32(2):115-118
- Majhi, S. K., Hattori, R. S., Yokota, M., Watanabe, S., Struessmann, C. A., 2009. Germ Cell Transplantation Using Sexually Competent Fish: An Approach for Rapid Propagation of Endangered and Valuable Germlines. *Plos One* 4(7)
- Morita, T., Kumakura, N., Morishima, K., Mitsuboshi, T., Ishida, M., Hara, T., Kudo, S., Miwa, M., Ihara, S., Higuchi, K. et al., 2012. Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of Spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Biol Reprod. United States*. p.176
- Nobrega, R. H, Greebe, C. D., van de Kant, H., Bogerd, J., de Franca, L. R., Schulz, R. W., 2010. Spermatogonial Stem Cell Niche and Spermatogonial Stem Cell Transplantation in Zebrafish. *Plos One* 5(9)
- Ogawa, T., Dobrinski, I., Avarbock, M. R., Brinster, R. L., 2000. Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Medicine* 6(1):29-34
- Okutsu, T., Suzuki, K., Takeuchi, Y., Takeuchi, T., Yoshizaki, G., 2006. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(8):2725-2729
- Okutsu, T., Takeuchi, Y., Yoshizaki, G., 2008. Spermatogonial Transplantation in Fish: Production of Trout Offspring from Salmon Parents. In: Tsukamoto, K., Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard Jr., T. D., Kaiser, M. J., editor. *Fisheries for Global Welfare and Environment*. Tokyo: Terrapub. p. pp. 209-219
- 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., Fujimoto, T., Kawakami, Y., Arai, K., Yamaha, E., 2010. Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *Int J Dev Biol* 54:1481-1486
- Takeuchi, Y., Higuchi, K., Yatabe, T., Miwa, M., Yoshizaki, G., 2009. Development of Spermatogonial Cell Transplantation in Nibe Croaker, *Nibea mitsukurii* (*Perciformes, Sciaenidae*). *Biology of Reproduction* 81(6):1055-1063
- Wong, T. T., Saito, T., Crodian, J., Collodi, P., 2011. Zebrafish Germline Chimeras Produced by Transplantation of Ovarian Germ Cells into Sterile Host Larvae. *Biol Reprod*. 84(6):1190-7

Rozsah grafických prací: **1 - 5 tabulek nebo grafů, 3 - 10 obrázků**  
Rozsah pracovní zprávy: **30 - 40 stran**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**  
Seznam odborné literatury: **viz příloha**

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Martin Pšenička, Ph.D.**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický  
Konzultant bakalářské práce: **Mgr. Zuzana Linhartová**  
Výzkumný ústav rybářský a hydrobiologický

Datum zadání bakalářské práce: **7. prosince 2012**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **30. dubna 2014**

  
prof. Ing. Otomar Linhart, DrSc.  
děkan

JIHOČESKÁ UNIVERZITA  
V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH  
FAKULTA VÝTVORNÝCH UMĚNÍ  
L.S.  
389 29 Veselý (2)

  
doc. Ing. Pavel Kozák, Ph.D.  
ředitel

V Českých Budějovicích dne 14. února 2013

## Obsah:

<b>1. Úvod</b> .....	9
<b>2. Literární rešerše</b> .....	10
2.1. Ohrožení ryb ve světě.....	10
2.1.1. Migrační překážky a úpravy toků .....	10
2.1.2. Ohrožení ryb znečištěním vody .....	11
2.1.3. Nadměrný mořský rybolov .....	11
2.1.4. Pytláctví .....	13
2.1.5. Kriticky ohrožené druhy ryb .....	13
2.2. Záradečné buňky .....	14
2.2.1. Spermatogonie a oogonie typu A.....	14
2.2.2. Gametogeneze .....	14
2.2.3. Chiméry zárodečné linie .....	15
2.3. Transplantační experimenty .....	16
2.3.1. Transplantace .....	16
2.3.2. První transplantace zárodečných buněk .....	17
2.3.3. Transplantace spermatogonií a oogonií u ryb .....	18
2.3.3.1. Alogenní transplantace u ryb .....	19
2.3.3.2. Xenogenní transplantace u ryb.....	23
2.3.4. Ekonomické aspekty použití spermatogonií a oogonií .....	26
<b>3. Materiál a metodika</b> .....	28
3.1. Ryby použité k experimentu .....	28
3.2. Imunoblotingová analýza .....	28
3.3. Imunohistochemická analýza gonád .....	29
3.4. Enzymatická disociace pohlavních buněk .....	29
3.5. Izolace zárodečných buněk .....	30
3.6. Imunocytochemická analýza buněk .....	30
3.7. Zkoumání zárodečných buněk pomocí elektronové mikroskopie .....	30
3.8. Transplantace zárodečných buněk .....	31
<b>4. Výsledky</b> .....	32
4.1. Výsledky imunoblotingové analýzy, imunohistochemické analýzy gonád a enzymatické disociace pohlavních buněk .....	32
4.2. Výsledky izolace zárodečných buněk .....	32

4.3. Výsledky transplantace zárodečných buněk .....	33
<b>5. Diskuse a závěr .....</b>	<b>37</b>
<b>6. Seznam použité literatury .....</b>	<b>40</b>
<b>7. Přílohy .....</b>	<b>47</b>
7.1. Příloha 1 .....	47
7.2. Příloha 2 .....	50
7.3. Příloha 3 .....	51
7.4. Příloha 4 .....	53
7.5. Příloha 5 .....	55
7.6. Příloha 6 .....	56
7.7. Příloha 7 .....	57
<b>8. Seznam zkratk .....</b>	<b>59</b>
<b>9. Abstrakt .....</b>	<b>60</b>



## 1. Úvod

Na světě existuje mnoho druhů ryb, které působením lidské činnosti vyhynuly nebo k vyhynutí nemají daleko, nedojde-li ke změnám přístupu v chování k životnímu prostředí a rybám jako takovým. Jedním z mnoha těchto důvodů je intenzivní legální a ilegální rybolov, který v kombinaci s dlouhou dobou pohlavního dozrávání u některých druhů ryb, způsobuje rapidní úbytky těchto populací, například u vyzy velké (*Huso huso*) či jiných druhů jeseterovitých ryb. V důsledku snižování stavů těchto ryb dochází také k zúžení genetické variability těchto druhů. Manipulace se zárodečnými kmenovými buňkami, nám nabízí nástroj pro zefektivnění reprodukce a konzervaci ohrožených druhů ryb. Tyto buňky je možné zmrazovat v tekutém dusíku a uchovávat tak genetickou informaci, jak samčího tak i samičího pohlaví. Může tak vzniknout genová banka, jak ohrožených tak i komerčně chovaných druhů ryb. Výběrem vhodného recipienta pro transplantaci těchto zárodečných buněk pak můžeme využít jeho potenciál k efektivnímu rozmnožování cílového druhu. V případě, že bude vybrán recipientní organismus například s kratší dobou dozrávání pohlavních orgánů, můžeme signifikantně zkrátit generační interval dárce zárodečných buněk.

Cílem této práce byla aplikace technik manipulace se zárodečnými buňkami na nejohroženější skupinu živočichů na zemi, jesetery. Jako dárce zárodečných buněk byl zvolen jeseter sibiřský (*Acipenser baerii*), který spadá podle Červené knihy ohrožených druhů do skupiny ohrožených a který dozrává v závislosti na populaci až okolo 20 let. Recipientem byl pak jeseter malý (*Acipenser ruthenus*), dozrávající již během 4-5 roku života. Podle mého názoru může tato práce přispět k doplnění znalostí o dané problematice a přinést cenné výsledky, jež mohou být následně využity k dalšímu zkoumání v této oblasti a uplatnění získaných poznatků v praxi.

## 2. Literární rešerše

### 2.1. Ohrožení ryb ve světě

Ohrožení ryb v rámci České republiky i v rámci světa je způsobeno více faktory, které je třeba si uvědomit a snažit se je optimálním způsobem minimalizovat. Níže jsou uvedeny některé z nich (migrační překážky a úpravy toků, znečištění vod, nadměrný mořský rybolov a pytláctví), které ovlivňují současný stav rybích populací a mají tak dopad na to, zda se některé druhy ryb stanou kriticky ohroženými či nikoli. Důležité je si uvědomit, že u druhů u nichž bude možné v budoucnu zvýšit efektivitu reprodukce například pomocí transplantace zárodečných buněk, bude také důležité navracet je do prostředí, ve kterém již budou minimalizovány příčiny, které způsobily současný nepřilíš vysoký stav dané rybí populace.

#### 2.1.1. Migrační překážky a úpravy toků

S rozvojem moderní společnosti se v 19. a hlavně 20. století začaly budovat na tocích migrační překážky. Mezi ně můžeme zahrnout hlavně příčné vodní stavby, jako jsou například jezy, stupně, malé vodní elektrárny, přehrady či zdymadla (*Raplík et al., 1989*). Ve starší legislativě nebyla zahrnuta nutnost budovat u těchto staveb rybí přechody, a tak se často tyto stavby stávaly pro ryby a jiné vodní živočichy nepřekonatelné (*Králová, 2001*). Na našem území tyto stavby způsobují znemožnění anadromní i katadromní migrace některých druhů ryb, jako je například kriticky ohrožený úhoř říční (*Anquilla anquilla*), jehož výtěrová migrace do Sargasového moře je z velké části omezena množstvím přehrad a malých vodních elektráren. Přirozený zpětný návrat juvenilních úhořů – tzv. monte – do našich řek je již ze stejného důvodu nemožný a musí probíhat cílenou leteckou přepravou do vnitrozemských oblastí. Z dalších druhů, které již také nemají možnost na naše území migrovat, je losos obecný (*Salmo salar*), ale díky programu Losos 2000 je jeho výskyt částečně obnoven na dolním toku Labe. Omezení migrace ryb je značným problémem i v jiných zemích světa (*Lusk et al., 2014*).

Dalšími důvody, které ohrožují rybí populace, jsou necitlivé úpravy vodních toků. Mezi něž patří narovnání meandrujících toků, čímž se zkrátí jejich délka. Upravování říčních břehů za pomoci nejrůznějších opevnění, které většinou snižují množství přirozených úkrytů pro ryby i jiné vodní živočichy. Odtěžení přirozených sedimentů a

zahloubení koryta, což může znamenat zánik přirozených trdlišť a omezení množství přirozené potravy (Pokorný, 2009).

### **2.1.2. Ohrožení ryb znečištěním vody**

Zvyšující se intenzita průmyslové a zemědělské výroby spolu se zvyšující se životní úrovní obyvatelstva s sebou nese vyšší produkci odpadních vod. Problémy se začaly stupňovat s nástupem průmyslové revoluce a pak především v druhé polovině 20. století (Kux, 1956; Lusk & Holčík, 1998). Znečištění povrchových vod je v rámci Evropy již v současné době z větší části eliminováno za pomoci čistíren odpadních vod. V České republice došlo k největšímu zlepšení stavu po změně politického režimu, kdy se začaly uplatňovat přísnější legislativní opatření vztahující se k vypouštění odpadních vod (Velíšek et al., 2014).

I přes zlepšující se průměrnou kvalitu se nese ve vodách dědictví minulosti, jako například v sedimentech usazené těžké kovy či polychlorované bifenyly, jež se kumulují u ryb v tucích (Harvey et al., 1974; Laws, 1993; Svobodová et al., 1987). I dnešní technologie čistírenských provozů nedokážou zachytit všechny znečišťující látky jako například hormonální sloučeniny a farmaka, která na ryby mají feminizační účinek (Routledge et al., 1998; Thorpe et al., 2000; Ying et al., 2002). V dnešní době je nejčastější příčinou úhynu ryb biologické znečištění a jím způsobený kyslíkový deficit. Dalším nebezpečným ukazatelem je koncentrace amoniaku  $\text{NH}_3$ , který je toxičtější než  $\text{NH}_4$ . Havarijní úhyn ryb může také způsobit únik nejrůznějších chemických látek, jako jsou kyanidy, tenzidy, pesticidy aj. Na kvalitě vody a proměnlivosti jejího chemického složení závisí přežití konkrétního vodního ekosystému a pestrost druhového spektra ryb žijících v něm. Špatná kvalita vodního prostředí v minulosti zapříčinila ústup celých populací citlivějších druhů ryb a napomohla v kombinaci s ostatními faktory k jejich ohrožení (Velíšek et al., 2014).

### **2.1.3. Nadměrný mořský rybolov**

Podle mořských biologů, je dnes nadměrný mořský rybolov jednou z největších hrozeb pro mořské ekosystémy. Díky nadměrnému mořskému rybolovu často dochází k odlovení větší části populace, která se poté není schopna přirozeně obnovit (<http://www.oceansentry.org/lang-en/overfishing/campaign.html>, 2015). Pokročilá technologie rybolovu a zvýšená poptávka po rybím mase a rybách obecně vedla

k zintenzivnění rybolovu, což způsobilo, že několik mořských druhů ryb je na pokraji vyhynutí nebo je uvedeno v Červené knize ohrožených druhů (<http://www.iucnredlist.org/search>, 2015). V dlouhodobém horizontu, může mít nadměrný mořský rybolov velmi negativní dopad na oceánská společenstva, protože destabilizuje potravní řetězce a ničí přírodní stanoviště mnoha vodních organismů (<http://www.oceansentry.org/lang-en/overfishing/campaign.html>, 2015).

Lovná zařízení jsou často neselektivní, a proto velmi často dochází k tomu, že v sítích uvíznou i druhy, které nejsou cíleně loveny jako například, mořské želvy, savci či hlavonožci a dochází tak k jejich úhynu (<http://www.greenpeace.org.uk/oceans/problems/bycatch-wasteful-and-destructive-fishing>, 2015). Například, na každou tunu ulovených krevet se tři tuny jiných organismů usmrtí a vyhodí. FAO poukázalo na to, že asi 25 % světově ulovených ryb na moři je hozeno přes palubu. Jelikož jsou uloveny neúmyslně, jsou nelegálními druhy na trhu, nebo jsou podřadné kvality a velikosti. Mnoho tímto způsobem ulovených ryb patří k ohroženým anebo nepříliš využívaným druhům. Z neúmyslně ulovených mořských živočichů se nakonec 95 % vyhodí (<http://www.oceansentry.org/lang-en/overfishing/campaign.html>, 2015). Vedlejší úlovek není omezen jen na právě nežádoucí druhy ryb, ale ovlivňuje všechny druhy mořského společenstva, včetně velryb, delfinů, lachtanů, albatrosů a želv. Například lov tuňáků je nepřímo zodpovědný za úhyn odhadem jednoho milionu žraloků ročně v důsledku používání neselektivních sítí (<http://www.greenpeace.org.uk/oceans/problems/bycatch-wasteful-and-destructive-fishing>, 2015).

Vzhledem k tomu, že rybolov je zdrojem potravy pro miliony lidí především z rozvojových zemí, není snadné jeho objem snížit. Nicméně, vědci a Výbor OSN pro udržitelný rozvoj volají po zdůraznění důležitosti přísnějších předpisů z oblasti rybolovu v oceánech a vnitrozemských vodách (<http://www.un.org/events/tenstories/06/story.asp?storyID=800#>, 2015). Udržitelný rybolov bude muset být nutností pro restabilizaci pobřežních ekosystémů.

Tento negativní vývoj populací ryb v mořích a oceánech do značné míry umožňuje rozvoj sladkovodních i mořských akvakulturních systémů. Tyto systémy, zvládnutím reprodukční biologie jednotlivých druhů ryb, mohou napomoci ke snížení nutnosti jejich lovu na volném moři. Transplantační techniky by mohly znamenat zefektivnění reprodukce u dlouhověkých druhů ryb jako je například tuňák obecný (*Thunnus orientalis*) či jeseterovití (*Acipenseriformes*).

#### 2.1.4. Pytláctví

Dalším faktorem, jež má negativní dopad na velikost populací ryb je pytláctví. Tento problém nabývá na významu především v chudších regionech. Jednou z velmi ohrožených skupin ryb vlivem pytláctví jsou jeseterovití a to hlavně kvůli produkci kaviáru.

Černý kaviár je jednou z nejhodnotnějších rybích komodit. Poptávka po tomto produktu v minulém století výrazně stoupala, čímž se zvýšil jak legální tak ilegální rybolov (Ludwig, 2008). Nejzranitelnější oblastí výskytu jeseterů je euroasie v oblasti úmoří Černého, Kaspického a Azovského moře (De Meuleaer & Raymakers, 1996; Pikitch et al., 2005).

Nejkritičtější situace nastala u vyzy velké v Kaspickém moři a v povodí Volhy zde byly její populace téměř vyhubeny (De Meuleaer & Raymakers, 1996). Podobná situace nastala i u tří dalších druhů. Prvním z nich je jeseter ruský (*Acipenser gueldenstaedti*), dalšími pak jeseter perský (*Acipenser persicus*) a jeseter hvězdnatý (*Acipenser stellatus*). Dochází u nich ke snižování početnosti populací, i přestože probíhají jejich reintrodukční chovy (Pikitch et al., 2005). V roce 1998 došlo kvůli neutěšené situaci k zařazení všech druhů jeseterů do příloh Úmluvy o mezinárodním obchodu s ohroženými a volně žijícími druhy živočichů a planě rostoucích rostlin – CITES. Důležitá je však ochrana přímo na místě výskytu a potírání pytláckých gangů.

#### 2.1.5. Kriticky ohrožené druhy ryb

Obecně lze kategorii kriticky ohrožený druh (C1) charakterizovat jako organismus bezprostředně ohrožený vyhubením, přežívající jen na několika lokalitách v malém počtu jedinců (Baruš et al., 1989).

Mezi kriticky ohrožené druhy ryb podle Červené knihy patří celkem 37 % doposud zmapovaných druhů živočichů a rostlin. Mezi kritické druhy řadíme i 16 druhů jeseterů jako například jesetera jihočínského (*Acipenser dabryanus*), jesetera ruského, jesetera severního (*Acipenser mikadoi*), jesetera perského či vyzy velkou jak již bylo zmíněno výše. Avšak pomocí experimentů se zárodečnými buňkami bychom mohli alespoň některé druhy, když už ne zcela zachránit, tak alespoň kryokonzervovat v genových bankách.

## 2.2. Záródečné buňky

### 2.2.1. Spermatogonie a oogonie typu A

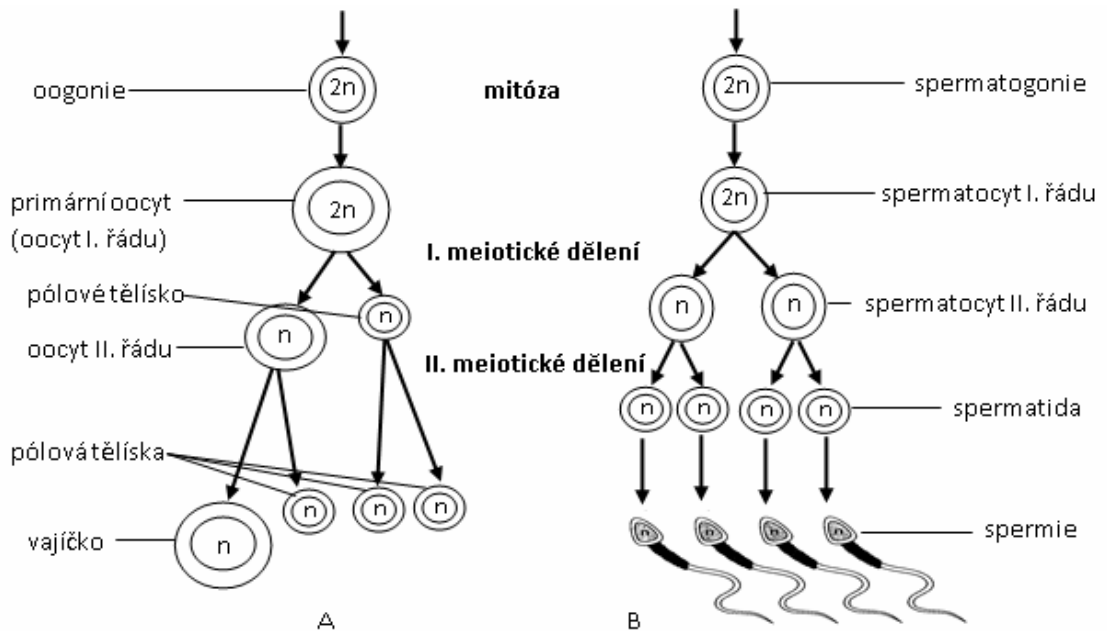
Tyto buňky můžeme definovat jako pluripotentní nediferenciované kmenové zárodečné buňky, které zajišťují produkci gamet. Juvenilní jedinci se vyznačují enormním množstvím spermatogonií (SG) i oogonií (OG) a prekurzorem těchto buněk jsou embryonální PGC neboli primordiální gonocyty. Těchto gonocytů je v embryu pouze několik desítek (*Alavi et al., 2008*). Pokud se tyto buňky používají k transplantacím je důležité je před izolací označit a to vpravením fluorescenční sondy do embrya pomocí skleněné ultratenké jehly v raném stádiu vývoje (*Wong et al., 2011*). PGC se vyznačují schopností migrace v období embryonálního vývoje a následným osídlením genitální rýhy. PGC se do embrya vpravují do blastodisku tedy již ve fázi blastuly (*Saito et al., 2011*). Kompletní gametogeneze pak může být obnovena i za použití jednoho PGC (*Saito et al., 2008*). Jeseteří embrya jsou však ve fázi blastuly na transplantaci velmi citlivá. SG a OG mají již schopnost migrace v těle velmi omezenou, proto se injikují přímo do genitální rýhy embrya či gonád. Oba dva typy zárodečných buněk jsou schopné po transplantaci do recipienta kolonizovat zárodečnou rýhu popřípadě gonády a díky jejich sexuální plasticitě obnovit jak tvorbu jiker tak i spermií v závislosti na pohlaví recipienta (*de Rooij et al., 1999; Ogawa et al., 2000; Ohta et al., 2000; Okutsu et al., 2006; Saito et al., 2010*). Z výše uvedeného textu jsou patrné výhody a nevýhody uplatnění PGC a SG/OG. Obecně lze říci, že u jeseterů je manipulace se SG a OG snadnější a je vhodná pro transplantace do již vykulených larev (*Pšenička et al., 2012*).

### 2.2.2. Gametogeneze

Spermie u ryb můžeme rozdělit do dvou typů. Prvním typem jsou takzvané aqua sperm, ty se vyskytují u kostnatých ryb a můžeme říci, že se jedná o primitivnější typ spermií. Druhým typem jsou spermie, u nichž můžeme nalézt zcela vyvinutý akrozom. Jedná se o chrupavčité druhy ryb, jako jsou veslonosi a jeseteří. Tyto spermie jsou fylogeneticky blízké savčím spermiím, i přestože se jedná o fylogeneticky starší skupinu ryb (*Alavi et al., 2008*).

Vývoj spermií (spermatogeneze) se u ryb uskutečňuje ve spermatocystách, které se vyskytují na bazální membráně semenotvorného (urogenitálního) kanálku. Můžeme je

definovat jako folikulární struktury vytvořené z buněčných klonů, které se nacházejí v různém vývojovém stupni. Tyto buňky jsou odvozeny z jediné PGC. Sertoliho buňky zabezpečují výživu pro zárodečné buňky a zároveň také zabezpečují samotnou spermatogenezi (Kalt, 1976; Schulz *et al.*, 2010).



Obr.1.: Spermatogeneze a oogeneze. Přezvato z Bártová (2014).

### 2.2.3. Chiméry zárodečné linie

Braat *et al.*, (1999) uvádí, že jako chiméru označujeme jedince, který vznikl spojením určitých částí či orgánů dvou či více jedinců. Chiméra zárodečné linie je speciální případ chimérismu, kdy se do embrya recipienta vpraví zárodečné buňky z donora a tyto buňky se v něm pak dále vyvíjí. Jako zárodečné buňky určené k transplantaci slouží PGC, SG či OG.

Vědci se už nějaký čas snaží uplatnit tvorbu zárodečných chimér u ryb. U některých druhů se jim to již podařilo, jako například u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) ve studii Okutsu *et al.*, 2006, tilapie nilské (*Oreochromis niloticus*) ve studiích Lacerda *et al.*, 2006; Lacerda *et al.*, 2008; Lacerda *et al.*, 2010; Lacerda *et al.*, 2013; Farlora *et al.*, 2013, lososa masu (*Oncorhynchus masou*) ve studiích Okutsu *et al.*, 2007; Okutsu *et al.*, 2008, gavúnovce patagonského (*Odontesthes hatcheri*) ve studii Majhi *et al.*, 2009, Nibeji mitsukurii ve studiích Takeuchi *et al.*, 2009; Higuchi *et al.*, 2010; Higuchi *et al.*, 2011, dania pruhovaného (*Danio rerio*) ve studiích Kawasaki *et al.*, 2010; Nóbrega *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2011, kranase japonského (*Seriola quinqueradiata*) ve studii

*Morita et al., 2012* a makrele japonské (*Scomber japonicus*) ve studiích *Yazawa et al., 2010; Yazawa et al., 2013*. Tyto experimenty jsou blíže popsány v kapitole 2.3.3. transplantace SG a OG u ryb.

## **2.3. Transplantační experimenty**

### **2.3.1. Transplantace**

Pojmem transplantace nepředstavuje pouze možnost přenosu zárodečných buněk, ale rozumíme jí také aplikaci předem separované tkáně či orgánu do těla jiného organismu. Pověštinou za její pomoci je nahrazována špatně fungující či poškozená tkáň, popřípadě i celý orgán (*Hořejší & Bartůňková, 2009*).

Podle původu transplantátu, tedy části těla jiného organismu, který transplantujeme, můžeme transplantace rozdělit do několika skupin. První z nich jsou autologní transplantace, při kterých transplantovaná tkáň či orgán je získán od stejného jedince, do kterého je následně transplantován (*Hořejší & Bartůňková, 2009*). Autotransplantát, je poté aplikován buď na stejné či obdobné místo, ale vždy u stejného organismu. Dalšími jsou transplantace syngenní a alogenní. Syngenní transplantace zahrnují transplantace, u kterých jsou donor i recipient geneticky shodní. Mezi takovéto organismy můžeme zařadit imbrední linie popřípadě i jednovaječná dvojčata. Oproti tomu pokud jsou donor a recipient geneticky odlišní, tak tuto transplantaci označujeme jako alogenní, pořád však jde o jeden druh živočicha. (*Farlora et al., 2013; Kawasaki et al., 2010; Lacerda et al., 2006; Lacerda et al., 2008; Lacerda et al., 2010; Lacerda et al., 2013; Morita et al., 2012; Nóbrega et al., 2010; Okutsu et al., 2006; Takeuchi et al., 2009; Wong et al., 2011*).

Když provádíme transplantaci mezi dvěma druhy organismů, tak se tato transplantace nazývá xenogenní (*Higuchi et al., 2010; Higuchi et al., 2011; Majhi et al., 2009; Okutsu et al., 2007; Okutsu et al., 2008; Yazawa et al., 2010; Yazawa et al., 2013*). Oba tyto typy transplantací však mohou vyvolat autoimunitní reakci, jejímž principem je reakce T – lymfocytů a domácího antigenu s cizím antigenem. Tato imunitní reakce se často projeví odumřením transplantovaných buněk, tkáně či orgánu a může vést až ke smrti jedince a to z důvodu výskytu infekce v místě transplantace. U exogenních transplantací je nevyhnutelně nutné imunologicky ošetřit recipienta ještě před transplantací. Jelikož bez tohoto ošetření by většinou nastala výrazná imunitní



reakce příjemce na nevlastní tkáň. Při použití exogenních transplantací je dobré použít transgenní jedince, kteří mají oslabený imunitní systém (*Hořejší & Bartůňková, 2009*).

Transplantace spermatogonií se rozdělují do několika kroků. Nejdříve se izolují a purifikují kmenové buňky, buňky je možné také v případě potřeby kryoprezervovat do doby než se použijí. Dále je třeba připravit organismy určené jako recipienty pro transplantaci a následně provést samotnou transplantaci.

Recipientní organismus musí velmi často projít před transplantací eliminací vlastních zárodečných buněk, aby nedocházelo ke kompeticím s transplantovanými SG, popřípadě je možné použít uměle vytvořený sterilní kmen recipienta. Pro tento účel se využívá několik dále vyjmenovaných technik, které umožní přerušení endogenní tvorby zárodečných buněk. První technikou je použití vysoké teploty (*Jegou et al., 1984*), dále studená ischemie (*Young et al., 1988*), poté použití radioaktivního ozáření (*Vandermeer et al., 1993*), aplikace protilátky zabraňující produkci gonadotropního hormonu (GnRH) (*Schlatt et al., 1999*), popřípadě využití sterilizačních látek (*Wang et al., 2010*). Jedním z těchto nejpoužívanějších produktů je busulfan, ten slouží jako DNA alkylační činidlo, jež se injekčně vpravuje do tělní dutiny recipientních organismů (*Wang et al., 2010*). V rámci transplantačních experimentů je třeba rozlišovat, zda spermie či jikry byly vytvořeny z endogenních nebo z transplantovaných SG. K jejich rozlišení se užívají metody genového inženýrství. Transgenní organizmy se často využívají k rozlišení exogenních buněk (*Izadyar et al., 2000*). Navíc je možné použít transgen pro fluorescenční protein, který se vyznačuje specifickou expresí jen v případě zárodečných buněk jako například zelený fluorescenční protein GFP s *vasa* proteinem (*Yoshizaki et al., 2000*).

### **2.3.2. První transplantace zárodečných buněk**

Poprvé byla technika transplantace zárodečných buněk použita ve studii Brinster & Zimmermann, (1994) na dospělých myších samčího pohlaví. Tato studie ukázala, že SG izolované z varlat dárce (samce myši) mají tendenci osidlovat sterilní varlata, pokud dojde k vpravení SG do semenotvorných kanálků. V tomto pokusu bylo použito celkem 22 recipientních jedinců, u nichž došlo k transplantaci a u čtyř z nich byla zjištěna probíhající spermatogeneze. Použitá sterilizace recipienta byla pomocí busulfanu v dávce  $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . Tato studie ukázala, že kmenové buňky mohou být odebírány z dárcovských varlat a udržovány *in vitro* po dobu několika hodin a následně přeneseny

do sterilního varlete příjemce, kde bude dále probíhat normální spermatogeneze a tvorba zralých spermií. Spermatogeneze dárcovských buněk v gonádách recipienta ukázala normální morfologický vývoj.

V další studii zabývající se transplantacemi kmenových buněk u myši byly použity dvě neplodné varianty myši (recesivní ocelově šedá a dominantní bílá). Bylo zjištěno, že kmenové buňky z neplodných samců byly schopny spermatogeneze a vytvoření zralých spermií. Transplantace zárodečných buněk z neplodné recesivní varianty ocelově šedé myši do mutanta samčího pohlaví neplodné formy dominantní bílé myši, byla obnovena plodnost u těchto recipientních myši. Tímto bylo zjištěno, že transplantace SG z neplodného dárce, do tolerantního testikulárního prostředí může obnovit plodnost a vést ke vzniku potomstva s genetickým uspořádáním neplodných dárcovských samců (*Ogawa et al., 2000*).

### **2.3.3. Transplantace spermatogonií a ogonií u ryb**

První transplantace zárodečných buněk u ryb byly poprvé provedeny o deset let později než u savců. Tyto transplantace byly realizovány pomocí PGC (*Takeuchi et al., 2003*). Nevýhodou se ukázal být malý počet těchto prekurzorů SG a OG a také velice krátký čas, po který se u donora vyskytují a je možné je separovat. Vhodným náhradním řešením se ukázalo použití SG či OG (*Okutsu et al., 2006*).

Mnohé ryby jsou dnes předmětem komerčního chovu a představují významnou součást lidské výživy, ale i přesto díky pytláctví, přílišnému rybolovu a zhoršeným životním podmínkám se některé druhy ryb staly ohroženými (*Myers & Worm, 2003*). Pro jejich záchranu je nezbytné zachovat bohatost genetické variability jednotlivých druhů ryb. Bohužel maternální část genetické informace, jež je uložena v jikrách či embryích, se zatím nepodařilo uchovat za pomoci kryoprezervace. Jelikož v obou případech se v nich nachází příliš mnoho žloutku, jejich membrána není dostatečně propustná a celkově jsou až moc velká (*Tsai et al., 2009*). Ke kryoprezervaci je vhodnější využít zárodečné kmenové buňky, jelikož mají menší velikost a nízký obsah tuku a podstatně nižší obsah žloutkových složek. Zároveň se tyto buňky mohou po transplantaci diferenciovat do obou typů gamet, spermií i vajíček (*Okutsu et al., 2006*).

Výhodou rybího organismu je vnější oplození (*Dubský et al., 2003*), toto je velmi podstatné z hlediska transplantačních technik, protože vnější oplození jiker umožňuje

snadnější manipulaci s vajíčky či embryi. Další podstatnou výhodou u ryb je, že čerstvě vylíhlý rybí organismus nemá vlastní imunitní systém natolik vyvinutý, aby docházelo k nepřijetí transplantovaných buněk donora recipientem. Například u lososovitých druhů ryb se imunitní systém vyvíjí až několik týdnů od vylíhnutí larev (*Manning & Nakanishi, 1996*).

Jelikož larvy ryb jsou velmi často malé a dosahují velikosti zřídka kdy větší než několik milimetrů, nebylo zprvu možné transplantovat SG ryb přímo do semenotvorného kanálku. Z tohoto důvodu se SG aplikovaly do peritoneální dutiny, i když jejich migrační schopnost byla velmi omezená, tak se za pomoci chemotaxe postupně přemísťovaly do gonád v rané fázi vývoje (*Yoshizaki et al., 2011*). Transplantaci SG přímo do varlat skrze urogenitální papilu provedl *Lacerda et al.* (2006). Následně docházelo ke kolonizaci zárodečné rýhy či gonád recipienta SG nebo OG donora (*Lacerda et al., 2008*). Transplantace zárodečných buněk mohou být dvojího typu: alogenní a xenogenní. Přičemž alogenními transplantacemi myslíme ty transplantace, u nichž je donor a recipient stejného druhu a u xenogenních se donor a recipient liší.

#### **2.3.3.1. Alogenní transplantace u ryb**

Prvním rybím druhem, který se uplatnil u transplantací SG byl pstruh duhový. Hlavním motivem jeho výběru bylo zejména jeho široké komerční využití a dosti velká velikost larev, s čímž se pojí i snadná manipulovatelnost s nimi (*Okutsu et al., 2006*). Jelikož bylo třeba zviditelnit výsledky transplantací, byl vyšlechtěn transgenní pstruh, který nesl ve svých buňkách gen pro GFP řízený cis- elementem *Vasa* genu. Specifická exprese *Vasa* genu v zárodečné linii buněk, do které patří PGC, SG, OG a oocyty a také spojení s transgenem pro GFP, vytvořila podmínky pro pozorování transplantovaných buněk uvnitř organismu příjemce těchto buněk (*Okutsu et al., 2006; Yano et al., 2008*). Buňky pro izolaci byly připraveny pomocí enzymatické disociace. Výsledná suspenze, která obsahovala zhruba 10 000 testikulárních buněk, byla aplikována pomocí mikroinjikace do břišní dutiny čerstvě vykuleného plůdku divoké formy pstruha duhového. Diferencující a proliferující buňky, které vznikly transplantací buněk donora, se projevovaly velmi vysokou, mohlo se zdát, že dokonce neomezenou mírou sebeobnovy. Tyto buňky se objevily v gonádách recipienta po uplynutí dvaceti dnů od transplantace. Po uplynutí jednoho roku od transplantace bylo provedeno křížení jiker

divoké formy pstruha s mlčím recipientů. Takto vzniklé potomstvo vykazovalo plně vyvinuté spermie obsahující genotyp dárce. Oocyty se začaly v gonádách tvořit po uplynutí sedmi týdnů. Plodnost u takovýchto jikernaček byla normální a u embryí produkovaných takovými jikernačkami se neprojevovaly následně žádné deformační vady. Za pomoci těchto experimentů bylo možno prokázat, že SG získané z dospělých pstruhů transplantované do ryb opačného pohlaví se vyvíjely ve funkční oocyty, čímž se prokázalo, že vývoj a diference buněk je především záležitostí tělního prostředí a není pouze úkolem samotných zárodečných buněk (*Okutsu et al., 2006*).

Dalším druhem, který je oblíbený jak z hlediska komerčního chovu, tak i jako modelový organizmus pro transplantace zárodečných buněk je tilapie nilská. Jejimi hlavními přednostmi, jak z pohledu hospodářského, tak experimentálního, je velmi dobrá přizpůsobivost prostředí, krátká doba růstu a rychlé dospívání. První pokusy s tímto druhem provedl *Lacerda et al. (2006)*, kde byl poprvé vyzkoušen způsob transplantace pomocí nechirurgické aplikace SG urogenitálním kanálkem přímo do varlat.

Tento postup byl dále uplatněn o dva roky později stejným autorským kolektivem, přičemž pro transplantaci byl použit také druh tilapie nilská, jako donor i recipient, šlo o dospělé sexuálně zralé jedince samčího pohlaví. Použitá sterilizace recipienta byla vysoká teplota vody (20, 25, 30 a 35 °C) a koncentrace busulfanu 15 a 18 mg.kg<sup>-1</sup>. Izolace zárodečných buněk probíhala pomocí Percoll gradientu a transplantované zárodečné buňky byly identifikovány pomocí trypan blue a červené fluorescenční barvy PKH26. Výsledkem bylo, že z celkového počtu 36 recipientů se u 33 z nich prokázala kolonizace gonád SG donora (*Lacerda et al., 2008*).

V další studii týkající se již zmiňovaného druhu tilapie nilské probíhala transplantace SG také pomocí nechirurgické metody vpravením SG urogenitálním kanálkem do gonád divoce zbarveného samce (*Chitralada tilapie*). Při čemž byl použit dárce červeně zbarvené tilapie. Z důvodu znemožnění tvorby vlastních pohlavních buněk byl u recipienta použit busulfan 15 nebo 18 mg.kg<sup>-1</sup> a vysoká teplota 35 °C. Po dvou měsících od transplantace byly takto vzniklé spermie recipienta použity k oplození jiker divoké formy tilapie nilské a ukázalo se, že vzniklé potomstvo vykazuje genotyp dárce. Obdobné výsledky byly dosaženy při opakování stejného pokusu s tím rozdílem, že byly použity SG, které prošly procesem kryokonzervace. Tyto buňky byly schopné

se dále diferencovat na spermie ve varlatech recipientů a tím bylo dokázáno, že samotná kryokonzervace nemá negativní vliv na schopnost SG kolonizovat a obnovit spermatogenezi v gonádách recipienta. Záleží však také na použitém kryoprotektivu a přežití těchto buněk (*Lacerda et al., 2010*).

Tentýž autor o tři roky později použil opět druh tilapie nilská ve své studii, jako donora i jako recipienta, přičemž od dárce odebral varlata, z nichž získal buněčnou kulturu SG pomocí Percoll gradientu a následně ji vpravil do sexuálně zralého dospělého samce tilapie nilské. Výsledkem bylo stoprocentní začlenění SG do gonád recipienta (*Lacerda et al., 2013*).

Ve studii Farlora *et al.*, (2013) je také zmíněna intraperitoneální transplantace SG u tilapie nilské. Prostřednictvím histologické analýzy brzkého vývoje gonád bylo stanoveno nejvhodnější stádium pro exogenní transplantaci zárodečných buněk do příjemce tedy tilapie nilské. Jako dárce byla použita transgenní tilapie nilská ve věku 5–12 měsíců nesoucí GFP s  $\beta$ -actin proteinem. Testikulární buňky byly obarveny PKH26 a vpraveny do peritoneální dutiny příjemce v larválním stádiu. Po 22 dnech od transplantace SG vykazovaly normální vývoj a byly začleněny do gonád recipienta. Další kontrola proběhla po pěti měsících a to v podobě prověření mlíčí a vitelogenních oocytů u jednoletých příjemců pomocí PCR a za použití specifických primerů. Výsledky této studie ukázaly, že dlouhodobé přežití, proliferace, diferenciace odvozených SG od dárce ve vitelogenních oocytech a funkčních spermiích je možná. Po dalších zlepšeních efektivity těchto intraperitoneálních transplantací by se tyto transplantace mohly stát cenným nástrojem v ochraně genetických zdrojů pro tento rybí druh.

Experimenty byly ale také prováděny u mořských druhů ryb. Jednou z mořských ryb, která byla použita k transplantacím SG, byla *Nibeia mitsukurii*. Ve studii Takeuchi *et al.*, (2009), byly použity SG typu A izolované z dospělých samců ve věku tří, šesti a šestnácti měsíců, jež byly označeny pomocí PKH26 a poté pomocí mikroinjektáže vpraveny do tělní dutiny larev stejného druhu. Následně po šesti týdnech byly identifikovány v genitální rýze SG, které byly odvozené od donora.

Další část autorů používala k transplantacím zárodečných buněk jako modelový organismus druh danio pruhované. Tento druh byl použit i ve studii Kawasaki *et al.*, (2010), kde jako donoři byly použity transgenní ryby, od kterých byly odebrány

neseparované testikulární buňky, z nichž byla vytvořena směs mezi buňkami *vas::EGFP* ryb a transgenních juvenilů a to v poměru 1:10. Tato směs byla následně transplantována pod kůži juvenilů do oblasti břišní dutiny. Aby se zabránilo hrozbě odmítnutí transplantovaných buněk recipientem, je nejvhodnější použít imbrední linii, která však nebyla dostupná. Z tohoto důvodu byl pokus proveden na transgenních zebřičkách (*vas::EGFP*). Po uplynutí několika následujících dní došlo k obnovení testikulární struktury, v níž byla zaznamenána spermatogeneze a testikulární buňky všech stádií byly produkovány déle než tři měsíce od transplantace. Zralými spermii byly oplodněny indické linie zebřiček z důvodu zjištění jejich plodnosti. Výsledné ryby byly po dosažení pohlavní zralosti plodné a jejich vývoj probíhal normálně.

Další transplantační experimenty u obou pohlaví dania pruhovaného byly provedeny ve studii Nóbrega *et al.*, (2010). Pro transplantaci byly použity SG typu A a u samců byla potlačena tvorba vlastních spermií pomocí busulfanu 30 a 40 mg.kg<sup>-1</sup> a vysoké teploty 35 °C po dobu jednoho týdne. Po třech měsících od transplantace byly transplantované fluorescenčně označené SG od dárce (*vas::EGFP*) již diferencované a vyskytovaly se u 30 % recipientů. Všechny SG se nenacházely ve stejném stupni vývoje. U samic byly SG transplantovány přímo do ovárií a po třech týdnech došlo k detekci skupin buněk odvozených ze SG. Po uplynutí dalšího týdne byly detekovány v samicích nejenom GFP oogonie, ale také plně diferencované oocyty vyvinuté ze SG donora.

Také vysoké produkce zárodečných chimér u danií bylo dosaženo pomocí transplantace ovariálních zárodečných buněk do sterilního příjemce, kterým byl hybrid dania duhového a dania pruhovaného. Ovariální zárodečné buňky byly získány ze tříměsíčních jedinců dania pruhovaného. Izolace zárodečných buněk byla provedena pomocí Percoll gradientu a zárodečné buňky byly vpraveny do břišní dutiny sterilních hybridních larev ve věku dvou týdnů. Po šesti týdnech od transplantace bylo zjištěno úspěšné kolonizování gonád a diferenciaci na spermie u hybridních recipientů samčího pohlaví. Z šedesáti sedmi dospělých recipientů bylo 12 (18 %) samčích chimér produkujících normální potomstvo. V případě, že byli tito recipienti reprodukováni s divokým typem samic, fertilizační úspěšnost byla v rozmezí od 23 do 56 %, ačkoli plodní samci chimér byli vytvořeni pomocí transplantace z ovariálních zárodečných buněk. F1 generace vzniklá pomocí chimérických samců obsahovala potomstvo obojího pohlaví. Což ukazuje, že určení samčího pohlaví u zebřiček není řízeno heterogamními

chromozomy. Výsledky studie ukazují, že populace vzniklé z ovariálních zárodečných buněk, které jsou přítomny ve vaječnicích dospělých zebřiček, mohou fungovat jako zárodečné kmenové buňky. Tyto buňky jsou pak schopné proliferace a diferenciací do testikulárních zárodečných buněk a funkčních spermií u samčích recipientů. Vysoké produkce zárodečných linií chimér bylo dosaženo s pomocí ovariálních zárodečných buněk a vhodně zvolené identifikace chimér u sterilních recipientů. Díky této studii můžeme říci, že transplantace u tohoto druhu je velmi užitečná pro genetické manipulace s tímto druhem (*Wong et al., 2011*).

Další alogenní transplantace byla provedena v Japonsku na kranasu japonském. Jako donoři SG typu A byli použiti samci kranasů japonských ve stáří deseti měsíců. SG byly fluorescenčně označeny a aplikovány pomocí mikroinjektoru do tělní dutiny larev divoké formy recipientů ve stáří osmi dní. Po uplynutí 28 dní za použití fluorescenční analýzy bylo zjištěno, že transplantace byla úspěšná. Transplantované zárodečné buňky se v recipientech vyvíjely až na funkční pohlavní buňky. Pohlavní produkty obou pohlaví získané z dospělých recipientů se dále použily pro vytvoření potomstva a to křížením s mlíčáky i jikernačkami divoké formy kranase japonského. Dalším z kroků bylo provedení DNA analýzy, která potvrdila, že z alogenních larev po transplantaci vznikly podle pohlaví recipienta zcela vývojově dokončené spermie i jikry (*Morita et al., 2012*).

### **2.3.3.2. Xenogenní transplantace u ryb**

Jedním z prvních transplantačních pokusů provedených u ryb různých druhů byla transplantace mezi hemizygotními transgenními jedinci pro GFP - *vasa* a z hlediska dominantní mutace oranžového zbarvení heterozygotními pstruhy duhovými. Recipientem SG se staly larvy divoké formy lososa masu. Oba druhy patří do stejného rodu (*Oncorhynchus*), ale je zajímavé, že při křížení těchto jedinců dochází ke vzniku neživotaschopných hybridů. Pro otestování výsledků transplantace byli dva roky po transplantaci křížení recipientní samci s jedinci divoké formy pstruha duhového. K reprodukci bylo použito všech třicet osm recipientních samic, avšak reprodukce nebyla příliš úspěšná, protože pouze potomci jedné samice byli nositeli genetické informace donora. Potomstvo zbylých jedinců uhynulo, jelikož šlo o letální hybridy. Z třiceti tří recipientních samečů tvořilo 16 z nich potomstvo nesoucí genetickou informaci z donora, což zapříčinilo jejich oranžové tělní zbarvení (*Okutsu et al., 2007*).

V předchozí transplantaci produkoval recipient gamety odvozené, jak ze svých zárodečných buněk, tak ze zárodečných buněk donora. K zefektivnění transplantačních experimentů byli použiti sterilní triploidní jedinci lososa masu. Pro transplantaci byly použity SG z již homozygotního oranžově zbarveného pstruha duhového. Jak se dalo očekávat, byly transplantace u triploidních jedinců úspěšnější než u nesterilních jedinců. Jelikož u šesti z osmi triploidních samic docházelo ke tvorbě jiker a dvanáct ze šestnácti samců tvořilo mlíčí odvozené od donora. K ověření vývoje zárodečných buněk byly tyto ryby po dvou letech mezi sebou reprodukovány a výsledkem bylo, že mladí jedinci měli oranžové zbarvení. Za pomoci tohoto experimentu bylo potvrzeno, že transplantováním SG do triploidních jedinců dochází ke vzniku zárodečné chiméry, produkující pouze jedince odvozené od donora či jde o neplodné jedince (*Okutsu et al., 2008*).

Další exogenní transplantaci provedl Majhi *et al.*, (2009), při níž použil SG separované z juvenilních (4–5 měsíčních) gavůnců argentinských a umístil je do gonád jednoletých pohlavně zralých gavůnců patagonských. Před transplantací však bylo třeba potlačit tvorbu endogenních zárodečných buněk u dospělého recipienta, toho bylo dosaženo za pomoci aplikace busulfanu v dávce  $40 \text{ mg.kg}^{-1}$  a vysoké teploty vody ( $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ) po dobu čtyř týdnů. Po uplynutí šesti měsíců došlo k obnově spermatogeneze. Recipienti vytvářeli ve svých gonádách spermie odvozené od donora. Tyto spermie byly použity k oplození divokých forem samic gavůnců argentinských. Po tomto oplození vznikli ze 13 % gavůnci argentinští a zbylé potomstvo tvořili hybridy obou druhů. Tyto transplantace potvrdily možnost reprodukce recipientních gavůnců a jejich schopnost produkovat potomstvo odvozené od donora.

Ve studii Higuchi *et al.*, (2010), byly transplantovány SG ze sexuálně zralého kranase japonského do larvy *Nibea mitsukurii*, tento recipient byl použit z důvodu kratšího generačního intervalu a malé velikosti těla. Tři týdny po transplantaci bylo viditelné začlenění SG do gonád u 72 z 88 recipientů. Antigenem proliferujících buněčných jader (Proliferating cell nuclear antigen) byla zjištěna proliferace transplantovaných xenogenních zárodečných buněk v gonádách recipientů. Ve studii bylo uvedeno, že tyto SG přežily jedenáct měsíců po transplantaci v gonádách recipientů. Díky tomu se ukázalo, že ryby druhu *N. mitsukurii* mohou být dobrými recipienty zárodečných buněk i u druhů ryb z odlišné taxonomické skupiny.



O rok později byl experiment se samcem kranase japonského a larvou *N. mitsukurii* zopakován, přičemž bylo potvrzeno, že larva *N. mitsukurii* je vhodným příjemcem exogenních zárodečných buněk a umožňuje jejich přežití, kolonizaci i proliferaci. Opět bylo tři týdny po transplantaci viditelné začlenění SG do gonád recipientů a po jedenácti měsících se opět začaly objevovat SG. To co však z této studie také vyplynulo, bylo, že gonády *N. mitsukurii* byly vhodné pouze pro vývoj samčích zárodečných buněk. Pomocí genetické analýzy spermatu se ovšem nepotvrdila genetická shoda s dárce. Je možné, že PCR analýza nebyla schopna detekovat malé množství vzorku DNA. Na základě takto zjištěných informací je důležité pokusy znovu zopakovat a zjistit, zda je možné u těchto druhů očekávat vývoj obou gamet odvozených od donora či nikoli (Higuchi *et al.*, 2011).

V dalším experimentu Yazawa *et al.* (2010) bylo snahou vytvořit systém umělé produkce gamet, velmi hospodářsky využívaného tuňáka obecného. To však nebylo možné provést přímo na tomto druhu, jelikož doposud nebyla známá optimální metoda transplantace jeho SG. Možnou alternativou se ukázalo být použití makrely japonské. Tento výběr proběhl hned z několika důvodů. Prvním z nich bylo jejich totožné zařazení do čeledi *Scombridae*. Pak také to, že makrela japonská je nejmenším zástupcem z této čeledi, vyskytující se v oceánech celého světa, ale především to, že její pohlavní produkty byly již v minulosti několikrát uměle získány. Jako donor posloužila *N. mitsukurii*, předchozí studie totiž prokázaly, že juvenilové ve stáří tří měsíců jsou v tomto případě ideálními dárce SG pro úspěšnou transplantaci (Higuchi *et al.*, 2010). Z druhu *N. mitsukurii* ve stáří tří měsíců byly tedy izolovány testikulární buňky, po jejich enzymatické disociaci byly označeny pomocí PKH26 a následně transplantovány do tělní dutiny larválního stádia makrely japonské. Po uplynutí třech týdnů od transplantace byly pomocí fluorescenčního mikroskopu v genitálních rýhách recipientů zjištěny buňky pozitivní na PKH26. Exogenní buňky se usadily na předpokládaném místě a probíhala u nich proliferace a diferenciace v gonádách recipienta. Přežití zárodečných buněk v xenogenním příjemci trvalo více než deset týdnů. Tímto pokusem bylo dokázáno, že v tělním prostředí makrely japonské je možný standardní průběh vývoje a dozrávání pohlavních buněk a je díky tomu vhodná pro mezidruhové transplantační experimenty SG. Z důvodu, že tuňák a makrela patří do stejné čeledi bude toto zjištění klíčové pro následnou možnost využití makrely pro efektivnější a

rychlejší produkci gamet tuňáka obecného za pomoci transplantace SG (*Yazawa et al., 2010*).

O tři roky později byl tento experiment zopakován, avšak nyní již posloužil jako donor samotný pacifický tuňák obecný a recipientem byla makrela japonská. Dále zde byla využita metoda molekulárních markerů k identifikaci zárodečných buněk s vysokou schopností k transplantaci a to pomocí lokalizace *dead end* genu. Kolonizace takto transplantovaných dárcovských zárodečných buněk byla úspěšná pouze s použitím sexuálně nezralých pacifických tuňáků. Tyto zárodečné buňky tuňáků obsahovaly vyšší podíl SG typu A než juvenilní a dospělé sexuálně zralé ryby. Tím bylo dokázáno, že metoda molekulárních markerů k identifikaci zárodečných buněk a lokalizace *dead end* genu je užitečným nástrojem pro identifikaci výše transplantability SG typu A u spermatogoniálních transplantací (*Yazawa et al., 2013*).

Všechny tyto výše uvedené transplantační studie, týkající se transplantace SG a OG u ryb jsou shrnuty v Příloze 1 (Tab. Ia, b.; Tab. II).

#### **2.3.4. Ekonomické aspekty použití spermatogonií a oogonií**

Počet kusů ryb chovaných v jednom hejnu drženém jako genetický zdroj by neměl klesnout pod 120 ks současně za udržení poměru jedinců 1:1 (*Flajšhans et al., 2009*), čemuž se odborně říká uchování *in vivo*. Pokud však chceme udržet velkou genetickou variabilitu v závislosti na možných ztrátách při napadení hejna nemocemi, změnou přírodních podmínek, či jinak zapříčiněném úhynu je žádoucí mít zakonzervovanou část genetické informace v *ex situ* a to bývá nejčastěji formou zamražení spermatu v tekutém dusíku. To je z ekonomického pohledu velmi efektivní (*Linhart et al., 2010*). Tato metoda je však použitelná pouze u mlíčáků, a nikoli u jikernaček. Jelikož jikra obsahuje příliš mnoho žloutku a při zamrazování dochází k jejímu prasknutí. SG a OG jsou vhodné jak ke kryoprezervaci, tak i k transplantaci. Díky čemuž je možné uchovávat i maternální DNA, a následně z ní obnovit gamety obojího typu, jak při alogenní, tak při exogenní transplantaci. Další předností manipulace se SG a OG je možnost jejich odběru a separace i krátce po úmrtí jedince. Což je nesmírně důležité, například při náhlém úhynu jedinců velmi vzácných druhů ryb, jakými jsou například jeseteři, jejichž genetický materiál můžeme uchovat pro následné použití (*Pšenička et al., 2012*).

Není možné vyčíslit přínos metody transplantace a kryoprezervace exaktně. Při porovnání nákladů na uchování genetického zdroje v *in situ* a v *ex situ* se dostávají prostředky na uchování ve stavu *ex situ* na výrazně nižší úroveň. Při započítání nákladů pouze na materiální zajištění chovu jako je například krmení a zanedbáme-li nákladné investice na opravy, práci a chov samotný např. vyzy velké, tak tyto náklady dosahují zhruba 14 600 Kč za rok na jeden kus. Oproti tomu uchování jedné dávky SG a OG, vyjde cenově při započítání spotřeby tekutého dusíku na 2,28 Kč za rok. Samozřejmě však není zcela žádoucí mít všechny genetické zdroje uchované pouze ve formě konzervovaných buněk, živý jedinec je zcela nenahraditelný (Pšenička *et al.*, 2012).

Největší výhodu můžeme spatřovat ve snížení ekonomických nákladů na udržování části genetických zdrojů ve formě *ex situ*, a také v možnosti jednodušší výměny genetického materiálu mezi jednotlivými pracovišti, zabývajícími se touto problematikou (Flajšhans *et al.*, 2009).

U jeseterovitých druhů ryb se do budoucna naskýtá možnost separace zárodečných buněk z později dospívajících druhů ryb a jejich transplantace do běžnějších druhů s kratší dobou dospívání. Příkladem může být separace SG či OG vyzy velké, která dozrává ve věku 16–20 let a její transplantace do jesetera malého, jež je schopný výtěru ve stáří 4–5 let. Zde by došlo asi ke čtyřnásobnému zkrácení generačního intervalu a další úspoře nákladů (Pšenička *et al.*, 2012).

### 3. Materiál a metodika

Všechny experimentální postupy byly schváleny komisí Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech.

#### 3.1. Ryby použité k experimentu

U jesetera sibiřského se experimenty konaly v recirkulačním akvakulturním systému při průměrné teplotě vody 10 °C. Byly použity gonády ze tří samců a tří samic, ve věku čtyř let. Gonády dosahovaly druhého stupně zralosti (obsahovaly ve varlatech převážně SG a ve vaječnicích OG a pre-vitellogenní oocyty) podle Chebanov & Galich (2009) a Wildhaber *et al.* (2006). Zralé samčí gonády v šestém stupni vývoje byly použity pro imunohistochemii. Larvy jesetera malého byly získány podle metodiky Gela *et al.* (2008). Čerstvě vylíhlé larvy, získané po smísení jiker a mlíčí ze tří jikernaček a mlíčáků, byly použity jako hostitelské organismy pro transplantaci.

#### 3.2. Imunoblotingová analýza

Proteiny byly extrahovány z pohlavních žláz a somatické tkáně (jako kontrola) s lyzáčním pufrém (8 M močovina, 2 M thiomočovina, 4% CHAPS, 10% w / v isopropanol, 0,1% w / v Triton X-100, 100 mM dithiothreitol) obsahující inhibitory proteázy (100 mM PMSF, 1 µg ml<sup>-1</sup> pepstainu, 5 µg ml<sup>-1</sup> 70 leupeptinu). Bradfordovo stanovení proteinů (Bradford, 1976) bylo použito ke stanovení proteinové koncentrace vzorků. Pro SDS-PAGE, vzorky 25 µg proteinů v jednom pruhu se resuspendovány v pufru obsahujícím 65 mM Tris, 10% (objem / objem) glycerolu, 2% (hmotnost / objem) SDS, a 5% (objem / objem) beta-merkaptoethanolu a ohřály se po dobu tří minut při teplotě 95 °C. Proteiny byly separovány v 12% SDS gelu. Po elektroforéze byly gely umístěny na poly-difluoridové membrány (BioRad, USA) a elektricky přeneseny. Membrány byly blokovány inkubací s 5 % (hmotnost / objem) odstředěného mléka v TBST (0,1% Tween-20, 20 mM Tris, 500 mM NaCl při pH 7,6) po dobu jedné hodiny při teplotě 20 °C. Membrány byly inkubovány po dobu 12 hodin při teplotě 4 °C v 5% bovinním sérovém albuminu (BSA) TBST obsahující protilátku DDX4 (GTX116575, Genetex) jako primární protilátku specifickou pro zárodečné buňky. Následně byly inkubovány s HRP-konjugovanou goat anti-rabbit IgG (1:3000 v 3% BSA-TBST) po dobu jedné hodiny při teplotě 20 °C. Zreagované proteiny byly zjištěny v 3,3', 5,5' tetramethylbenzidinovém kapalném substrátu.

### 3.3. Imunohistochemická analýza gonád

Fragmenty gonád a svalů (jako kontrola) byly fixovány v 4% paraformaldehydu a ve fosfátovém pufru PBS po dobu jedné hodiny; byly 3× promyty v PBS po dobu deseti minut; poté byly vloženy do 7,5%, a následně do 15% sacharózy po dobu 2,5 hodiny při teplotě 4 °C; a poté do 7,5, 15, a 20% želatiny po dobu 12 hodin při teplotě 37 °C. Bločky vzorků zalité v želatině byly následně zamrazeny na -80 °C. Vzorky byly dále nakrájeny na CM 1850 Kryostat (Leica, Německo) při teplotě -20 °C a umístěny na mikroskopické podložní sklíčko. Sklíčka byla inkubována v PBS s 1% BSA a 0,05% blokovacím roztokem (Tween 20) po dobu 40 minut, pak v DDX4 protilátce zředěné 300× blokovacím roztokem po dobu 12 hodin při 4 °C, pak došlo k promytí 3× v blokovacím roztoku po dobu deseti minut, dále pak k obarvení sekundární protilátkou goat anti-rabbit IgG-FITC (F0382, Sigma) a zředění 80× v blokovacím roztoku, promytí 3× v PBS a v označujícím roztoku DAPI (3 ng ml<sup>-192</sup>) po dobu deseti minut. Poté byly fragmenty gonád a svalů pokryty roztokem Vectashieldu (chránící před vysvícením fluorescentů) a zakryty krycím sklíčkem a dále následovalo pozorování pod fluorescenčním mikroskopem IX83 (Olympus, Japonsko), vybaveným ORCA R2 kamerou (Hamamatsu Photonics, Japonsko) a data byla zpracována v softwaru CellSens Olympus.

### 3.4. Enzymatická disociace pohlavních buněk

K určení optimálních podmínek pro buněčnou disociaci bylo 1,5 ml gonád rozděleno do 15 zkumavek obsahujících buď 5 ml PBS (Sigma-Aldrich P4417), Hankův vyvážený solný roztok (HBSS, Sigma-Aldrich H6648) nebo Leibovitzovo médium (L-15, Sigma-Aldrich L5520) s různými koncentracemi trypsinu (T) a kolagenázy (C): 1) 0,1% T a 0,1% C; 2) 0,3% T; 3) 0,1% T; 4) 0,3% C nebo 5) 0,1% C. Tkáně byly inkubovány po dobu dvou hodin při teplotě 23 °C. Osmolalita média byla upravena použitím krevní plazmy ryb (průměr 238 mOsm kg<sup>-1</sup>) a pH bylo upraveno na hodnotu 8 pro optimální aktivitu enzymů. Do suspenze určené k disociaci zárodečných buněk bylo přidáno 40 µg DNAsy pro eliminaci DNA poškozených buněk a snížení lepivosti. Získaná suspenze byla přefiltrována přes filtr o velikosti pórů 50 µm (Partec, Německo), který slouží ke sběru zbytku tkání, větších nedisociovaných buněk a větších oocytů. Pro zastavení enzymatické reakce bylo přidáno 1% BSA. Zkumavky suspenze pohlavních buněk byly centrifugovány při 500 g po dobu 30 minut za teploty 4 °C. Pelety se resuspendovaly v 0,3 ml média bez enzymů. Početnost a životaschopnost buněk získaných z každé kombinace byla vyhodnocena pomocí

hemocytometru (Burkerova počítací komůrka) a Live / Dead Cell barvícího kitu (Sigma-Aldrich, 04511). Resp. počet buněk byl počítán ve 20 čtvercích hemocytometru ve třech opakováních pod mikroskopem (Olympus BH2) při 100 násobném zvětšení. Pro test životaschopnosti bylo počítáno nejméně 500 buněk ve vzorku, výsledky byly zaznamenány pomocí mikroskopu Olympus IX83.

Pro porovnání procenta živých buněk a výtěžnosti různých disociačních médií, byla použita dvoucestná ANOVA programu Statistica určená pro Windows, v. 9.1 (StatSoft, Inc., USA). Pravděpodobnostní hodnoty  $P < 0,05$  byly považovány za významné.

### **3.5. Izolace zárodečných buněk**

Suspenze buněk pohlavních žláz byla získána za použití disociačního postupu. Tato buněčná suspenze byla nanášena na diskontinuální roztok Percollu (Sigma-Aldrich) P1644 s koncentračním gradientem 5, 10, 20, 30, 40 a 50 % v PBS (obr. 2) a centrifugována při 800 otáčkách za minutu po dobu 30 minut podobně jako Yoshikawa *et al.* (2009). Každý gradient byl přenášen pomocí pipety do nové zkumavky a zředěna 1:10 v PBS a opět odstředěna při 800 otáčkách za minutu po dobu 30 minut. Pelety byly resuspendovány v PBS a zkoumány s použitím imunofluorescenčního značení.

### **3.6. Imunocytochemická analýza buněk**

Oddělené buňky z pohlavních žláz se somatickými buňkami z ploutví a svalů (jako kontrola) byly umístěny na mikroskopická sklička potažená vrstvou poly-L-lysinu a fixována 4% paraformaldehydem v PBS po dobu jedné hodiny. Fixované buňky byly promyty v PBS a permeabilizovány s 0,3% Triton X-100, a následně zpracovány stejným způsobem, jak již bylo popsáno v kapitole 3.3. Imunohistochemická analýza gonád.

### **3.7. Zkoumání zárodečných buněk pomocí elektronové mikroskopie**

Buňky byly fixovány 2,5% glutaraldehydem v PBS po dobu 24 hodin při teplotě 4 °C. Následně byly opakovaně promyty v PBS a fixovány ve 4% oxidu osmičelém po dobu dvou hodin při teplotě 4 °C. Dále byly buňky opakovaně promyty v PBS, dehydratovány pomocí acetonu a zality do pryskyřice (Polybed 812). Takto vzniklé vzorky byly nakrájeny na ultra tenké proužky pomocí ultramikrotomu Leica UCT (Leica, Německo), dvakrát obarveny uranyl acetátem a citrátem olova a následně pozorovány pomocí transmisního elektronového mikroskopu (JEOL 1010, JEOL Ltd).

### **3.8. Transplantace zárodečných buněk**

Larvy jesetera malého s FITC-značenými endogenními PGC podle Saito *et al.* (2014) byly použity jako hostitelské organismy. Čtyřicet larev bylo použito pro testikulární a čtyřicet pro ovariální buňky. Izolované zárodečné buňky získané pomocí Percoll gradientu byly označeny za použití PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kitu, který slouží pro značení buněčné membrány podle protokolu výrobce. Separované zárodečné buňky byly vloženy do skleněné kapiláry a injikovány, v blízkosti oblasti, kde se bude vyvíjet genitální rýha hostitele (obr. 3, 4) pomocí mikromanipulátoru M-152 (Narishige, Japonsko) a microinjektoru CellTram Vario (Eppendorf, Německo) pod fluorescenčním stereomikroskopem M165FC (obr. 5). Larvy byly chovány při teplotě 18 °C a krmeny nitěnkami a suchým krmivem. Čtyři recipienti z každé skupiny byli zkoumáni v desetidenních intervalech v průběhu 50 dní pomocí fluorescenčního stereoskopického mikroskopu.

## **4. Výsledky**

### **4.1. Výsledky imunoblotingové analýzy, imunohistochemické analýzy gonád a enzymatické disociace pohlavních buněk**

Histologické vyšetření potvrdilo, že druhá fáze zralosti u čtyřletého samce jesetera sibiřského, který byl chován v akvakulturních podmínkách při průměrné teplotě vody 10 °C, je optimální pro izolaci SG (obr. 6). Gonády byly v této fázi vývoje dostatečně velké, obsahovaly 1–4 SG nebo OG ve spermatocystě a obsah tuku v této fázi byl relativně nízký (obr. 7a, b, c). Výrazně nejvyšší výtěžnosti testikulárních a ovariálních buněk bylo dosaženo po disociaci tkání s použitím PBS s 0,3% trypsinu (T), naopak výrazně nejnižší výnos byl zaznamenán u 0,1% kolagenázi (C) v porovnání se všemi použitými médii (PBS, HBSS, L-15) (obr. 8a, b) ( $P < 0.05$ ). Pomocí testu životaschopnosti nebyly zjištěny žádné statisticky významné rozdíly s výjimkou skupiny s nejnižším procentem životaschopných buněk 0,1 % C v HBSS (obr. 8c, d) ( $P < 0.05$ ).

### **4.2. Výsledky izolace zárodečných buněk**

Disociované testikulární buňky byly separovány s použitím Percoll gradientu od 5 do 50 %. Suspenze nižší koncentrace Percollu než 10 % obsahovala většinou pouze tuk. Vrstva s 10, 20, 30, 40 a 50 % Percoll gradientu obsahovala 79,6; 82,4; 76,3; 40,5 a 33 % testikulárních buněk a 83,6; 74,6; 54,2; 21,9 a 10,4 % ovariálních buněk obarvenými DDX4 protilátkou. Zatím co somatické buňky použité jako kontrola nevykazovaly žádnou fluorescenci. Koncentrace Percoll gradientu mezi 40 a 50 % obsahovala především krevní buňky a malé testikulární somatické buňky bez fluorescence. Na základě tohoto zjištění bylo použito 10–30 % Percoll gradientu pro izolaci zárodečných buněk z gonád jesetera sibiřského (obr. 9a, b). Takto odebrané buňky z 10–30 % Percoll gradientu byly následně zkoumány pomocí elektronové mikroskopie. Většina odebraných buněk vykazovala charakteristické vlastnosti SG a OG typu A, kterými jsou velké jádro s málo kondenzovaným chromatinem a jedním nebo dvěma kompaktními jádérky (obr. 10a, b).

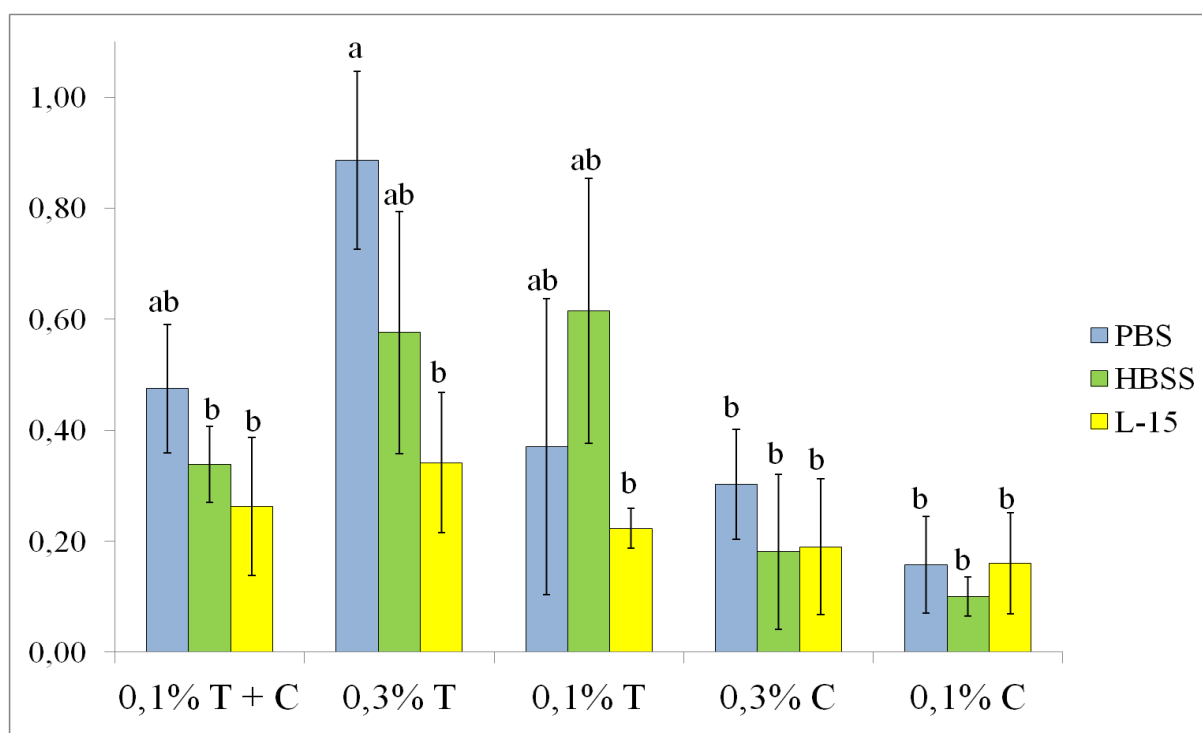


### 4.3. Výsledky transplantace zárodečných buněk

SG jesetera sibiřského byly úspěšně transplantovány do čerstvě vylíhlých larev jesetera malého. Označené buňky pomocí PKH26 a FITC-dextranu byly sledovány v živých larvách po dobu šesti dní (obr. 11a). Míra přežití se nelišila mezi larvami užitými k transplantaci a larvami v kontrole (96,7% a 95,8%). Transplantované testikulární a ovariální buňky byly nalezeny u 95 a 90 % zkoumaných larev. Po 30 a 40 dnech od transplantace byly transplantované buňky nalezeny v břišní dutině v okolí genitální rýhy a po padesáti dnech byly již lokalizovány v genitální rýze (obr. 11b, c).

**Tab. IIIa: Relativní výtěžnost testikulárních buněk** (T – trypsin, C – kolagenáza, PBS- Phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich P4417), HBSS- Hankův vyvážený solný roztok (Sigma-Aldrich H6648) a L-15 Leibovitzovo médium (Sigma-Aldrich L5520).

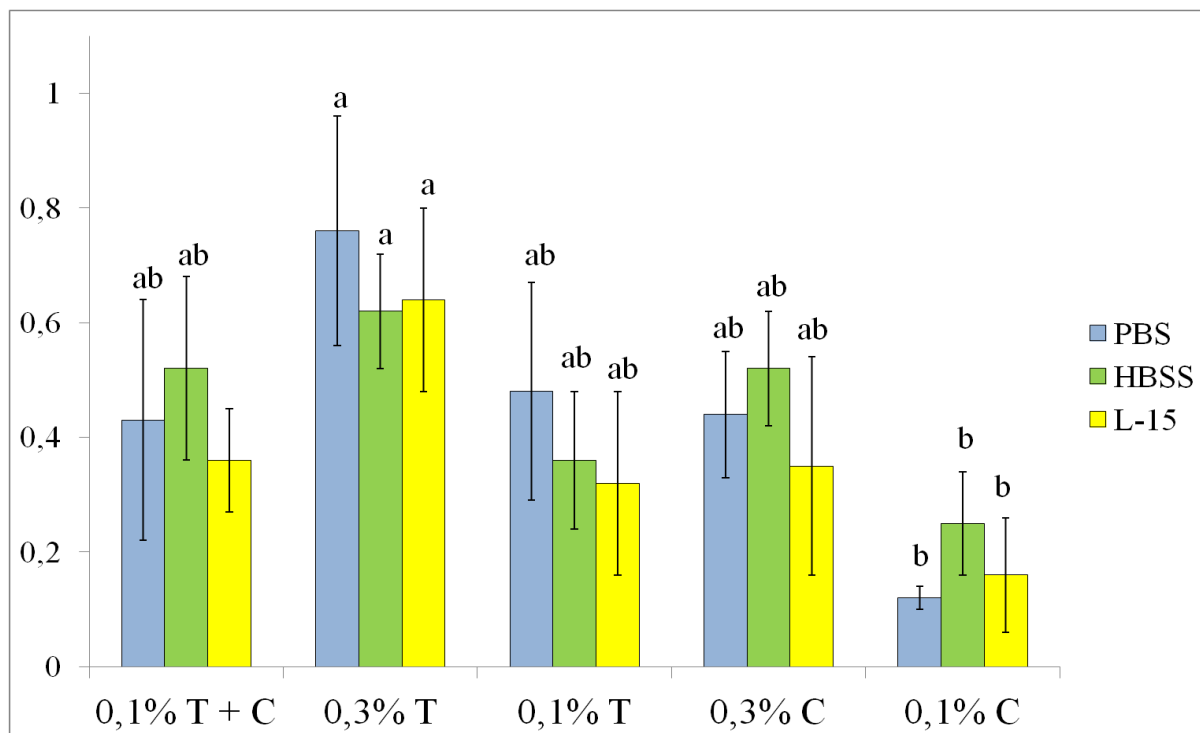
	0,1% T + C	0,3% T	0,1% T	0,3% C	0,1% C
<b>PBS</b>	0,47 ± 0,12	0,89 ± 0,16	0,37 ± 0,27	0,30 ± 0,10	0,16 ± 0,09
<b>HBSS</b>	0,34 ± 0,17	0,58 ± 0,22	0,62 ± 0,24	0,18 ± 0,14	0,10 ± 0,04
<b>L-15</b>	0,26 ± 0,12	0,34 ± 0,13	0,22 ± 0,04	0,19 ± 0,12	0,16 ± 0,09



Obr. 8a: Relativní výtěžnost testikulárních buněk (T – trypsin, C – kolagenáza, PBS- Phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich P4417), HBSS- Hankův vyvážený solný roztok (Sigma-Aldrich H6648) a L-15 Leibovitzovo médium (Sigma-Aldrich L5520).

**Tab. IIIb: Relativní výtěžnost ovariálních buněk** (T – trypsin, C – kolagenáza, PBS- Phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich P4417), HBSS- Hankův vyvážený solný roztok (Sigma-Aldrich H6648) a L-15 Leibovitzovo médium (Sigma-Aldrich L5520).

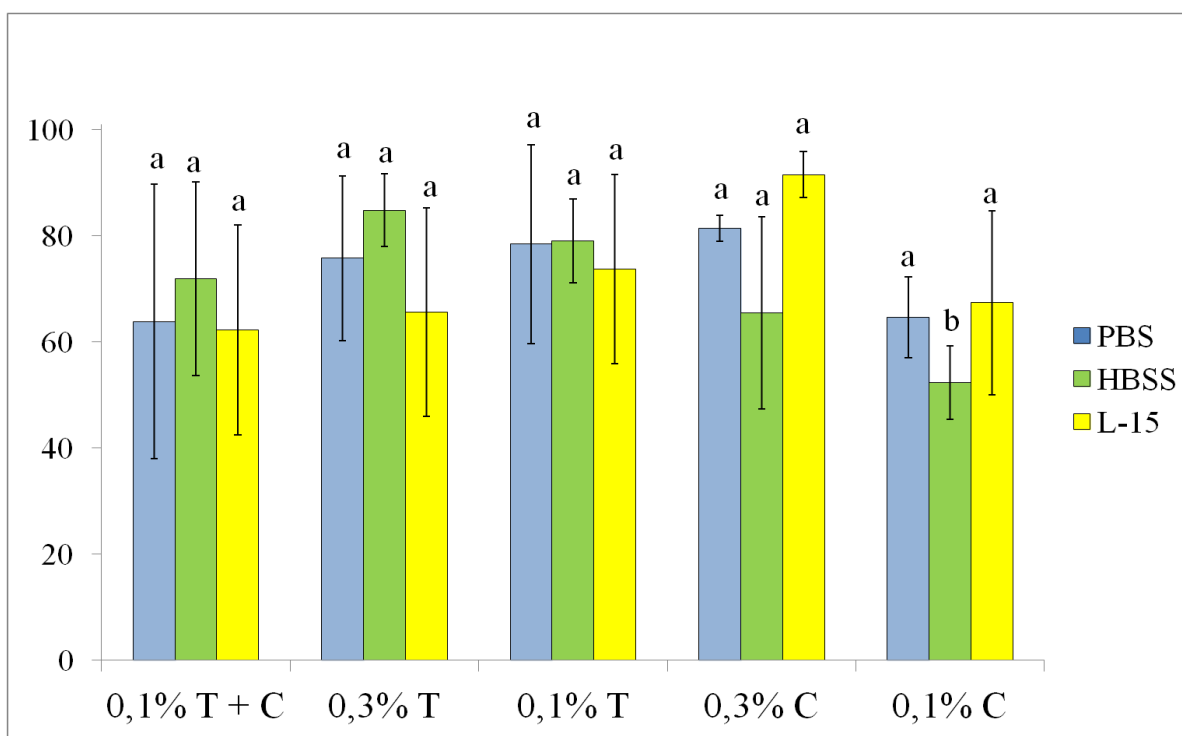
	0,1% T + C	0,3% T	0,1% T	0,3% C	0,1% C
<b>PBS</b>	0,43 ± 0,21	0,76 ± 0,20	0,48 ± 0,19	0,44 ± 0,11	0,12 ± 0,02
<b>HBSS</b>	0,52 ± 0,16	0,62 ± 0,10	0,36 ± 0,12	0,52 ± 0,10	0,25 ± 0,09
<b>L-15</b>	0,36 ± 0,09	0,64 ± 0,16	0,32 ± 0,16	0,35 ± 0,19	0,16 ± 0,10



Obr. 8b: Relativní výtěžnost ovariálních buněk (T – trypsin, C – kolagenáza, PBS- Phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich P4417), HBSS- Hankův vyvážený solný roztok (Sigma-Aldrich H6648) a L-15 Leibovitzovo médium (Sigma-Aldrich L5520).

**Tab. IIIc: Životoschopnost testikulárních buněk** (T – trypsin, C – kolagenáza, PBS- Phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich P4417), HBSS- Hankův vyvážený solný roztok (Sigma-Aldrich H6648) a L-15 Leibovitzovo médium (Sigma-Aldrich L5520).

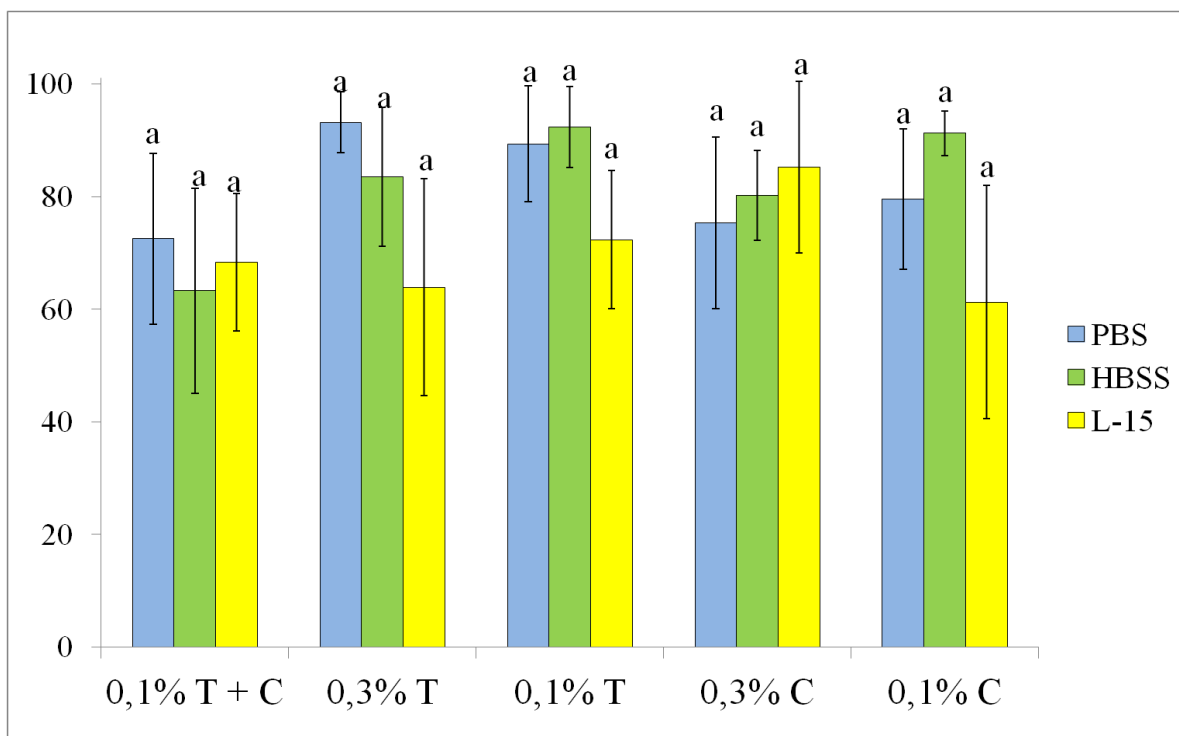
	0,1% T + C	0,3% T	0,1% T	0,3% C	0,1% C
<b>PBS</b>	63,87 ± 25,89	75,81 ± 15,49	78,45 ± 18,72	81,44 ± 2,49	64,67 ± 7,65
<b>HBSS</b>	71,93 ± 18,27	84,83 ± 6,86	79,06 ± 7,91	65,56 ± 18,13	52,35 ± 6,95
<b>L-15</b>	62,26 ± 19,82	65,61 ± 19,64	73,77 ± 17,88	91,55 ± 4,33	67,45 ± 17,34



Obr. 8c: Životoschopnost testikulárních buněk (T – trypsin, C – kolagenáza, PBS-Phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich P4417), HBSS- Hankův vyvážený solný roztok (Sigma-Aldrich H6648) a L-15 Leibovitzovo médium (Sigma-Aldrich L5520).

**Tab. III d: Životaschopnost ovariálních buněk** (T – trypsin, C – kolagenáza, PBS-Phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich P4417), HBSS- Hankův vyvážený solný roztok (Sigma-Aldrich H6648) a L-15 Leibovitzovo médium (Sigma-Aldrich L5520).

	0,1% T + C	0,3% T	0,1% T	0,3% C	0,1% C
<b>PBS</b>	72,52 ± 15,21	93,2 ± 5,36	89,36 ± 10,3	75,35 ± 15,25	79,56 ± 12,5
<b>HBSS</b>	63,25 ± 18,27	83,52 ± 12,30	92,36 ± 7,24	80,2 ± 8,00	91,25 ± 3,97
<b>L-15</b>	68,36 ± 12,21	63,89 ± 19,30	72,35 ± 12,25	85,22 ± 15,21	61,25 ± 20,73



Obr. 8d: Životaschopnost ovariálních buněk (T – trypsin, C – kolagenáza, PBS-Phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich P4417), HBSS- Hankův vyvážený solný roztok (Sigma-Aldrich H6648) a L-15 Leibovitzovo médium (Sigma-Aldrich L5520).

## 5. Diskuse a závěr

V této bakalářské práci jsem se zabýval řadou způsobů enzymatické disociace pomocí Percoll gradientu a transplantací testikulárních a ovariálních buněk z jesetera sibiřského do jesetera malého. Jeseter malý je celkem běžným druhem s menší hmotností a kratším reprodukčním cyklem (okolo pěti let). Oproti tomu jeseter sibiřský je větší a jeho reprodukční cyklus je okolo 18–28 let. Navíc se tento druh řadí mezi ohrožené druhy živočichů (*Ludwig et al., 2009*). Důležité je také to, že oba druhy jsou fylogeneticky blízce příbuzné, což umožňuje jejich vzájemné křížení a použití v transplantačních experimentech.

Brinster & Zimmermann, (1994) byli první, kdo poprvé použili transplantaci SG. Jako modelový organismus byla použita myš. Přičemž SG byly vpraveny do neplodného příjemce, tím bylo prokázáno, že tyto buňky mohou kolonizovat a rozvíjet se ve varlatech recipientů, kde vytváří plodné spermie s genotypem donora. Autoři v této studii použili k izolaci zárodečných buněk koncentraci 0,1 % kolagenázy a 0,25 % trypsinu a separační metodu pro zjištění vývojové fáze zárodečných buněk u samců myši, provedenou na základě rychlosti sedimentace v koncentračním gradientu 2–4% BSA.

Dále byla tato technika uplatněna například u pstruha duhového při alogenní transplantaci a při xenogenní transplantaci SG ze pstruha duhového do lososa masu (*Okutsu et al., 2007*). Po enzymatické disociaci varlat pstruha 0,5 % trypsinu v PBS bylo zjištěno, že po transplantaci do peritoneální dutiny příjemce kolonizují testikulární zárodečné buňky gonády recipienta a produkují funkční spermie a jikry (*Okutsu et al., 2007*).

SG transgenního dárce byly identifikovány za použití zeleného fluorescenčního proteinu, řízeného cis elementy vasa genů. SG tilapie nilské, dalšího modelového organismu, enzymaticky disociované a izolované pomocí Percoll gradientu, byly transplantovány do urogenitálního kanálku (*Lacerda et al., 2006*).

Izolace a transplantace byla také popsána u OG pstruha duhového (*Yoshiyoshizaki et al., 2010*) a u dania pruhovaného (*Wong et al., 2011*). Izolace u pstruha byla provedena pomocí media L-15 obsahující 0,2 % kolagenázy a 500 IU ml<sup>-1</sup> a v případě dania pruhovaného za pomoci PBS obsahující 0,2 % kolagenázy.

Manipulace s OG může být obzvláště u jeseterovitých druhů ryb považována za významnou metodu, protože se jedná o samičí heterogametní určení pohlaví (ZW samice / ZZ samec). Konzervace genetické informace založené pouze na samčích zárodečných

buňkách, nemusí být tedy efektivní, protože tyto buňky nemusí obsahovat kompletní genetickou informaci (Pšenička *et al.* 2015).

Autoři se vždy snaží zajistit ideální teplotu vody pro daný druh během enzymatické disociace a vyrovnat například nízkou teplotu delší dobou expozice (například danio pruhované 28,5 °C po dobu jedné hodiny a pstruh duhový 10 °C po dobu 7–9 hodin).

V této bakalářské práci naopak výsledky ukázaly, že použití 0,3 % trypsinu v PBS při teplotě 23 °C pro disociaci testikulárních a ovariálních buněk se jeví jako optimální. Tímto médiem se disocioval nejvyšší počet buněk bez snížení životaschopnosti. Na druhou stranu jako statisticky nejhorší enzymatická disociace se ukázala ta s použitím 0,1% kolagenázy.

V současné době se vědci vyhýbají disociaci zárodečných buněk trypsinem. V nedávné studii Shikina *et al.*, (2013) odhalili narušení membránových proteinů pstruha duhového inkubací v trypsinu, což způsobilo reverzibilní snížení proliferace buněk. Ta může být obnovena prostřednictvím krátkodobých *in vitro* kultur.

V této bakalářské práci však byla inkubace s trypsinem vyhodnocena jako neefektivnější. Testikulární a ovariální buňky se mohly proliferovat v gonádách recipientů po transplantaci podobně jako endogenní buňky. To znamená, že buňky byly alespoň částečně schopné se obnovovat a kultivovat v tělní dutině recipienta.

Nedávná studie Rzepkowska a Ostaszewska (2013) ukázala, že začátek proliferace a diferenciace u jesetera ruského a jesetera sibiřského se vyskytuje kolem 115 dne po vylíhnutí. Tato studie uvádí zvýšený počet FITC endogenních zárodečných buněk u jesetera ruského.

Transplantované buňky jesetera sibiřského, značené pomocí PKH26, byly v recipientovi pozorovány po 97 dnech od vylíhnutí, což koreponduje s prací Rzepkowska a Ostaszewska (2013).

Co se týče značení buněk donora, musíme konstatovat, že jednoduché označování pomocí PKH26 asi není příliš vhodné k identifikaci mezidruhových zárodečných linií chimér z důvodu možné kontaminace se somatickými buňkami. Z tohoto důvodu by bylo v budoucnu nejspíše dobré použít k identifikaci zárodečných linií druhově specifické genetické markery.

Další možná technika pro vytvoření zárodečné chiméry je transplantace PGC, ale počet vizualizovaných PGC z jednoho samostatného jeseteřího embrya je v průměru pouze 23,5 (Saito *et al.*, 2014). Z hlediska efektivity není tento typ transplantace příliš vhodný. Místo toho se doporučuje používání transplantace SG a OG z důvodu vyšší výtěžnosti z jednoho jedince.

V této bakalářské práci byla výtěžnost obarvených buněk protilátkou DDX4 z jednoho jesetera přibližně jeden milion. Takového vysokého množství vizualizovaných buněk vzhledem k relativně velké velikosti gonád, bylo nejspíše dosaženo, tím, že byl použit starší jedinec, ve srovnání se studií (Wong *et al.*, 2011), který izoloval ovariální buněk z dania pruhovaného.

Izolované SG a OG je možné kryoprezervovat v tekutém dusíku, čímž získáme možnost uchování jak paternální tak i maternální DNA. Jelikož jikry a embrya kryoprezervovat nelze. Za pomoci těchto transplantačních technik bude možné hypoteticky zkrátit dobu pohlavního dozrávání u ryb s dlouhým generačním intervalem při použití recipienta s kratším generačním intervalem. Transplantační experimenty u ohrožených druhů ryb jsou vhodným tématem pro další výzkum. Do budoucna by bylo také dobré vyzkoušet obdobný experiment s použitím sterilizovaného recipienta.

## 6. Seznam použité literatury

- ALAVI, S. M. H., COSSON, J. J., COWARD, K. & RAFIEE, G. (2008). *Fish spermatology*. Alpha Science International Ltd, Oxford, p. 465, ISBN: 978-1-84265-369-2.
- BARUŠ, V. (Ed.). (1989). *Červená kniha 2*. Státní zemědělské nakladatelství, Praha, p. 133, ISBN: 80-209-0060-8.
- BRAAT, A. K., ZANDBERGEN, T., VAN DE WATER, S., GOOS, H. J. T. & ZIVKOVIC, D. (1999). Characterization of zebrafish primordial germ cells: morphology and early distribution of vasa RNA. *Developmental Dynamics* 216: 153–167.
- BRADFORD, M. M. (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248–254.
- BRINSTER, R. L. & ZIMMERMANN, J. W. (1994). Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91 (24): 11298–11302.
- DE MEULEAER, T. & RAYMAKERS, C. (1996). *Sturgeons of the Caspian Sea and the international trade in caviar*. Traffic International, Cambridge, UK., p. 71, ISBN: 185850113.
- DE ROOIJ, D. G., OKABE, M. & NISHIMUNE, Y. (1999). Arrest of spermatogonial differentiation in jsd/jsd, SI17H/ SI17H, and cryorchid mice. *Biology of Reproduction* 61 (3): 842–847.
- DUBSKÝ, K., KOUŘIL, J. & ŠRÁMEK, V. (2003). *Obecné rybářství*. Informatorium, Praha, p. 312, ISBN: 80-7333-019-9.
- FARLORA, R., IHARA, H. S., TAKEUCHI, Y., HAYASHI, M., OCTAVERA, A., ALIMUDDIN & YOSHIZAKI, G. (2013). Intraperitoneal germ cell transplantation in the Nile Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Marine Biotechnology* 16 (3): 309–320.
- FLAJŠHANS, M., HULÁK, M., KAŠPAR, V., RODINA, M., KOCOUR, M. & GELA, M. (2009). *Metodika uchování genetických zdrojů ryb v živé genové bance*. Edice Metodik, FROV JU, Vodňany, č. 91.
- GELA, D., RODINA, M. & LINHART, O. (2008). *Řízená reprodukce jeseterů (Acipenser)*. Edice Metodik, VÚRH JU Vodňany, č. 78.
- HARVEY, G. R., MIKLAS, H. P., BOWEN, V. T. & STEINHAEUER, W. G. (1974). Observations on the distribution of chlorinated hydrocarbons in Atlantic Ocean organisms. *Journal of Marine Research* 32 (2): 103–118.



- HIGUCHI, K., TAKEUCHI, Y., MIWA, M., YAMAMOTA, Y., TSUNEMOTO, K. & YOSHIZAKI, G. (2010). Colonization, proliferation and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. *Fisheries Science* 77: 69–77.
- HIGUCHI, K., TAKEUCHI, Y., MIWA, M., YAMAMOTO, Y., TSUNEMOTO, K. & YOSHIZAKI, G. (2011). Colonization, proliferation and survival of intraperitoneally transplanted yellowtail *Seriola quinqueradiata* spermatogonia in nibe croaker *Nibea mitsukurii* recipient. *Fisheries Science* 77 (1): 69–77.
- HOŘEJŠÍ, V. & BARTUŇKOVÁ, J. (2009). *Základy imunologie*. Triton, Praha, p. 316, ISBN: 978-80-7387-280-9.
- CHEBANOV, M. & GALICH, E. (2009). *Ultrasound diagnostics for sturgeon broodstock management*. South Branch, Federal Center of Selection and Genetics for Aquaculture. Krasnodar, Russia, p. 1–115.
- IZADYAR, F., CREEMERS, L. B., VAN DISSEL-EMILIANI, F. M. F., VAN PELT, A. M. M. & DE ROOIJ, D. G. (2000). Spermatogonial stem cell transplantation. *Molecular and Cellular Endocrinology* 169 (1-2): 21–26.
- JEGOU, B., LAWS, A. O. & DEKRETSER, D. M. (1984). Changes in testicular function induced by short-term exposure of the rat testis to heat – further evidence for interaction of germ-cells, sertoli cells and leydig-cells. *International Journal of Andrology* 7 (3): 244–257.
- KALT, M. R. (1976). Morphology and kinetics of spermatogenesis in *xenopus-laevis*. *Journal of Experimental Zoology* 195 (3): 393–407.
- KAWASAKI, T., SAITO, K., SHINYA, M., OLSEN, L. C. & SAKAI N. (2010). Regeneration of spermatogenesis and production of functional sperm by grafting of testicular cell aggregates in Zebrafish (*Danio rerio*). *Biology of Reproduction* 83 (4): 533–539.
- KRÁLOVÁ, H. (Ed.). (2001). *Řeky pro život: revitalizace řek a péče o nivní biotopy*. Veronica, Brno, p. 439, ISBN: 80-238-8939-7.
- KUX, Z. (1956). *Příspěvek k ichtyofauně dolní Moravy a Dunaje*. Acta Musei Moraviae 41: 93–112.
- LACERDA, S. M. S. N., BATLOUNI, S. R., SILVA, S. B. G., HOMEM, C. S. P. & FRANÇA, L. R. (2006). Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Animal Reproduction* 3 (2): 146–159.
- LACERDA, S. M. S. N., BATLOUNI, S. R., ASSIS, L. H., RESENDE, F. M., CAMPOS-SILVA, S. M., CAMPOS-SILVA, R., SEGATELLI, T. M. & FRANCA, L. R. (2008). Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cybium* 32 (2): 115–118.
- LACERDA, S. M. S. N., BATLOUNI, S. R., COSTA, G. M. J., SEGATELLI, T. M., QUIRINO, B. R., QUEIROZ, B. M., KALAPOTHAKIS, E. & FRANCA, L. R.

- (2010). New end fast technique generace offspring after germ cells transplantation in adult fish: the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. *Plos One* 5: e10740.
- LACERDA, S. M. S. N., COSTA, G. M. J., DA SILVA, M. D. A., CAMPOS-JUNIOR, P. H. A., SEGATELLI, T. M., PEIXOTO, M. T. D., RESENDE, R. R. & FRANCA, L. R. (2013). Phenotypic characterization and *in vitro* propagation transplantation of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) spermatogonial stem cells. *General and Comparative Endocrinology* 192: 95–106.
- LAWS, E. A. (1993). *Aquatic pollution: an introductory text*. John Wiley & Sons, Honolulu, p. 611, ISBN: 0-471-53457-9.
- LINHART, O., DZYUBA, B., BORYSHPOLETS, S. & RODINA, M. (2010). *Zmrazování spermatu jesetera malého (Acipenser ruthenus)*. Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod, České Budějovice, p. 21, ISBN: 978-80-87437-03-2.
- LUDWIG, A. (2008). Identification of Acipenseriformes species in trade. *Journal of Applied Ichthyology* 24: 2–11.
- LUDWIG, A., LIPPOLD, S., DEBUS, L. & REINARTZ, R. (2009). First evidence of hybridization between endangered sterlets (*Acipenser ruthenus*) and exotic Siberian sturgeons (*Acipenser baerii*) in the Danube River. *Biological Invasions* 11:753–760.
- LUSK, S. & HOLČÍK, J. (1998). *Význam bezbariérového spojení říčního systému Moravy a Dyje na území České republiky s Dunajem*. In: LUSK, S. & HALAČKA, K. (Eds), Biodiverzita ichtyofauny ČR (II): 69–93.
- LUSK, S., HARTVICH, P. & LOJKÁSEK, B. (2014). *Migrace ryb a migrační prostupnost vodních toků*. Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod, p. 254, ISBN: 978-80-87437-77-3.
- MAJHI, S. K., HATTORI, R. S., YOKOTA, M., WATANABE, S. & STRUESSMANN, C. A. (2009). Germ cell transplantation using sexually competent fish: An Approach for rapid propagation of endangered and valuable germ lines. *Plos One* 4 (7): e6132.
- MANNING, M. J. & NAKANISHI, T. (1996). The specific immune system: cellular defenses. In: Iwama G, Nakanishi T (Eds.) *The fish immune system: organism, pathogen, and environment*. Academic Press, San Diego, Kalifornie, p. 159–205.
- MORITA, T., KUMAKURA, N., MORISHIMA, K., MITSUBOSHI, T., ISHIDA, M., HARA, T., KUDO, S., MIWA, M., IHARA, S., HIGUCHI, K., TAKEUCHI, Y., YOSHIZAKI, G. (2012). Production of donor-derived offspring by allogeneic transplantation of spermatogonia in the yellowtail (*Seriola quinqueradiata*). *Biology of reproduction* 86 (6): 1-11.
- MYERS, R. A. & WORM, B. (2003). Rapid worldwide depletion of predatory fish communities. *Nature* 423 (6937): 280–283.

- NÓBREGA, R. H., GREEBE, C. D., VAN DE KANT, H., BOGERD, J., DE FRANÇA, L. R. & SCHULZ, R. W. (2010). Spermatogonial stem cell niche and spermatogonial stem cell transplantation in zebrafish. *Plos One* 5 (9): e12808.
- OGAWA, T., DOBRINSKI, I., AVARBOCK, M. R. & BRINSTER, R. L. (2000). Transplantation of male germ line stem cells restores fertility in infertile mice. *Nature Medicine* 6 (1): 29–34.
- OHTA, H., YOMOGIDA, K., DOHMAE, K. & NISHIMUNE, Y. (2000). Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF. *Development* 127 (10): 2125–2131.
- OKUTSU, T., SUZUKI, K., TAKEUCHI, Y., TAKEUCHI, T. & YOSHIZAKI, G. (2006). Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8): 2725–2729.
- OKUTSU, T., SHIKINA, S., KANNO, M., TAKEUCHI, Y. & YOSHIZAKI, G. (2007). Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science* 317 (5844): 1517–1517.
- OKUTSU, T., TAKEUCHI, Y. & YOSHIZAKI, G. (2008). *Spermatogonial transplantation in fish: Production of trout offspring from salmon parents*. In: Tsukamoto, K., Kawamura, T., Takeuchi, T., Beard, T. D. & Kaiser, M. J. (Eds). Fisheries for global welfare and environment. Terra publishing, Tokyo, p. 209–219.
- PIKITCH, E. K., DOUKAKIS, P., LAUCK, L., CHAKRABARTY, P. & ERICKSON, D. L. (2005). Status trends and management of sturgeon and paddlefish fisheries. *Fish and Fisheries* 6: 233–265.
- POKORNÝ, J. (2009). *Vodní hospodářství - Stavby v rybářství*. Informatorium, Praha, p. 318, ISBN: 978-80-7333-071-2.
- PŠENIČKA, M., SAITO, T., RODINA, M., LINHARTOVÁ, Z. & FLAJŠHANS, M. (2012). *Izolace a zmrazování spermatogonií a oogonií jeseterů pro účely uchování genetických zdrojů*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, Vodňany, p. 22, ISBN: 078-80-87437-68-1.
- PŠENIČKA, M., SAITO, T., LINHARTOVÁ, Z. & GAZO, I. (2015). Isolation and transplantation of sturgeon early-stage germ cells. *Theriogenology* 83: 1085–1092.
- RAPLÍK, M., VÝBORA, P. & MAREŠ, K. (1989). *Úprava tokov*. Alfa, Bratislava, p. 639, ISBN: 80-05-00128-2.
- ROUTLEDGE, E. J., SHEAHAN, D., DESBROW, C., BRIGHTY, G. C., WALDOCK, M. & SUMPTER, J. P. (1998). Identification of estrogenic chemicals in STW effluent.2. *In vivo* responses in trout and roach. *Environmental Science & Technology* 32: 1559–1565.

- 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. *Biology of Reproduction* 78: 159–166.
- SAITO, T., GOTO-KAZETO, R., FUJIMOTO, T., KAWAKAMI, Y., ARAI, K. & YAMAHA, E. (2010). Inter-species transplantation and migration of primordial germ cells in cyprinid fish. *International Journal of Development Biology* 54: 1481–1486.
- 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 (9): e24460
- SAITO, T., PSENICKA, M., GOTO-KAZETO, R., INOUE, K., ADACHI, S., ARAI, K. & YAMAHA, E. (2014). The origin and migration of primordial germ cells in sturgeons. *Plos One* 9 (2): e86861
- SHIKINA, S., NAGASAWA, K., HAYASHI, M., FURUYA, M., IWASAKI, Y. & YOSHIZAKI, G. (2013). Short-term *in vitro* culturing improves transplantability of type a spermatogonia in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Molecular Reproduction and Development* 80:763–773.
- SCHLATT, S., ROSIEPEN, G., WEINBAUER, G. F., ROLF, C., BROOK, P. F. & NIESCHLAG, E. (1999). Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes. *Human Reproduction* 14 (1): 144–150.
- SCHULZ, R. W., DE FRANCA, L. R., LAREYRE, J. J., LEGAC, F., CHIARINI-GARCIA, H., NOBREGA, R. H. & MIURA, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *General and Comparative Endocrinology* 165 (3): 390–411.
- SVOBODOVÁ, Z. (1987). *Toxikologie vodních živočichů*. Ministerstvo zemědělství a výživy ČR a Český rybářský svaz, Státní zemědělské nakladatelství, Praha, p. 231.
- RZEPKOWSKA, M. & OSTASZEWSKA, T. (2013). Proliferating cell nuclear antigen and vasa protein expression during gonadal development and sexual differentiation in cultured Siberian (*Acipenser baerii* Brandt, 1869) and Russian (*Acipenser gueldenstaedtii* Brandt & Ratzeburg, 1833) sturgeon. *Reviews in Aquaculture* 5: 1–14.
- TAKEUCHI, Y., YOSHIZAKI, G. & TAKEUCHI, T. (2003). Generation of live fry from intraperitoneally transplanted primordial germ cells in rainbow trout. *Biology of Reproduction* 69 (4): 1142–1149.
- TAKEUCHI, Y., HIGUCHI, K., YATABE, T., MIWA, M. & YOSHIZAKI G. (2009). Development of spermatogonial cell transplantation in Nibe Croaker, *Nibe mitsukurii* (Perciformes, Sciaenidae). *Biology of Reproduction* 81 (6): 1055–1063.

- TSAI, S., RAWSON, D. M. & ZHANG, T. (2009). Studies on chilling sensitivity of early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles. *Cryobiology* 58 (3): 279–286.
- THORPE, K. I., HUTCHINSON, T. H., HETHERIDGE, M. J., SUMPTER, J. P. & TYLER, C. R. (2000). Development of an *in vivo* screening assay for estrogenic chemicals using juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 19 (11): 2812–2820.
- VANDERMEER, Y., HUISKAMP, R., DAVIDS, J. A. & DE ROOIJ, D. G. (1993). Differential effects of fractionated X irradiation on mouse spermatogonial stem cells. *Radiation research* 135 (2): 222–228.
- VELÍŠEK, J., SVOBODOVÁ, Z., BLÁHOVÁ, J., MÁCHOVÁ, J., STARÁ, A., DOPŠÍKOVÁ, R., ŠIROKÁ, Z., MOUDRÁ, H., VALENITOVÁ, O., RANDÁK, T., ŠTĚPÁNOVÁ, S., MARŠÁLEK, P., KOCOUR KROUPOVÁ, H., GRABIC, R., ZUSKOVÁ, E., BARTOŠKOVÁ, M. & STANCOVÁ, V. (2014). *Vodní toxikologie pro rybáře*. Jihočeská univerzita, Fakulta rybářství a ochrany vod, p. 600, ISBN: 978-80-87547-89-6.
- WANG, D. Z., ZHOU, X. H., YUAN, Y. L. & ZHENG, X. M. (2010). Optimal dose of busulfan for depleting testicular germ cells of recipient mice before spermatogonial transplantation. *Asian Journal of Andrology* 12 (2): 263–270.
- WILDHABER, M. L., PAPOULIAS, D. M., DELONAY, A. J., TILLITT, D. E., BRYAN, J. L. & ANNIS, M. L. (2006). *Development of methods to determine the reproductive status of Pallid sturgeon in the Missouri river*, Final Science Report to U.S. Fish and Wildlife Service. USGS Final Science Support Program Report.
- WONG, T. T., SAITO, T., CRODIAN, J. & COLLODI, P. (2011). Zebrafish germline chimeras produced by transplantation of ovarian germ cells into sterile host larvae. *Biology of Reproduction* 84 (6): 1190–1197.
- YANO, A., SUZUKI, K. & YOSHIZAKI, G. (2008). Flow-cytometric isolation of testicular germ cells from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) carrying the green fluorescent protein gene driven by trout vasa regulatory regions. *Biology of Reproduction* 78 (1): 151–158.
- YAZAWA, R., TAKEUCHI, Y., HIGUCHI, K., YATABE, T., KABEYA, N. & YOSHIZAKI, G. (2010). Chub mackerel gonads support colonization, survival, and proliferation of intraperitoneally transplanted xenogenic germ cells. *Biology of Reproduction* 82 (5): 896–904.
- YAZAWA, R., TAKEUCHI, T., MORITA, T., ISHIDA, M. & YOSHIZAKI, G. (2013). The Pacific bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) dead end gene is suitable as a specific molecular marker of type A spermatogonia. *Molecular Reproduction & Development* 80: 871–880.
- YING, G. G., KOOKANA, R. S. & RU, Y. J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment international* 28 (6): 545–551.

- YOSHIKAWA, H. K., MORISHIMA, T., FUJIMOTO, T., SAITO, T., KOBAYASHI, E., YAMAHA, E. & ARAI, K. (2009). Chromosome doubling in early spermatogonia produces diploid spermatozoa in a natural clonal fish. *Biology of Reproduction* 80: 973–979.
- 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. *International Journal of Developmental Biology* 44 (3): 323–326.
- YOSHIZAKI, G., ICHIKAWA, M., HAYASHI, M., IWASAKI, Y., MIWA, M., SHIKINA, S. & OKUTSU, T. (2010). Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development* 137 (8): 1227–1230.
- 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. *Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics* 6 (1): 55–61.
- YOUNG, G. P. H, GOLDSTEIN, M., PHILLIPS, D. M., SUNDARAM, K., GUNSALUS, G. L. & BARDIN, C. W. (1988). Sertoli cell-only syndrome produced by cold testicular ischemia. *Endocrinology* 122 (3): 1074–1082.

#### **Elektronické zdroje:**

- Bártová, E. (2014) *Biologie a genetika pro bakaláře*. [cit. 2015-04-23] [online]. Dostupné z <[https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-rozmnozovani\\_a\\_vyvoj&lang=cz](https://cit.vfu.cz/opvk2014/?title=teorie-rozmnozovani_a_vyvoj&lang=cz)>
- Bycatch – Wasteful and Destructive Fishing*, (2007) [cit. 2015-04-23] [online]. Dostupné z <<http://www.greenpeace.org.uk/oceans/problems/bycatch-wasteful-and-destructive-fishing>>
- Overfishing: A Threat to Marine Biodiversity*, [cit. 2015-04-23] [online]. Dostupné z <<http://www.un.org/events/tenstories/06/story.asp?storyID=800#>>
- Overfishing: Oceans are Dying*, (2009) [cit. 2015-04-23] [online]. Dostupné z <<http://www.oceansentry.org/lang-en/overfishing/campaign.html>>
- The IUCN Red List of Treated Species. (2014) [cit. 2015-04-23] [online]. Verze 2014.3. Dostupné z <<http://www.iucnredlist.org/search>>

## 7. Přílohy

### 7. 1 Příloha 1

**Tabulka Ia: Přehled alogenních transplantací provedených u ryb.**

Rok	Autor	Donor	Věk, pohlaví dárce	Recipient	Věk, pohlaví příjemce	Použitá sterilizace recipienta	Izolace zárodečných buněk	Identifikace zárodečných buněk	Identifikace chimér
2006	Okutsu <i>et al.</i>	Pstruh duhový ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )	9 měsíců (sexuálně zralý)	Pstruh duhový ( <i>O. mykiss</i> ) sameci i samice	32–35 denní po sterilizaci	—	—	Vasa-GFP	Vasa-GFP
2006	Lacerda <i>et al.</i>	Tilapie nilská ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	4–5 měsíců (sexuálně zralý)	Tilapie nilská ( <i>O. niloticus</i> )	4–5 měsíců (sexuálně zralý)	Busulfan, teplota vody 20°C, 25°C, 30°C a 35°C	Percoll gradient	PKH26, Trypan blue	PKH26, Trypan blue
2008	Lacerda <i>et al.</i>	Tilapie nilská ( <i>Oreochromis niloticus</i> )	Dospělý jedinec (sexuálně zralý samec)	Tilapie nilská ( <i>O. niloticus</i> )	Dospělý jedinec (sexuálně zralý samec)	Busulfan 15 a 18 mg/kg, teplota vody 20°C, 25°C, 30°C a 35°C	Percoll gradient	Trypan blue	PKH26
2009	Takeuchi <i>et al.</i>	( <i>Nibeas mitsukurii</i> )	3, 6 a 16 měsíců (samec)	( <i>N. mitsukurii</i> )	Larva	—	Spg. enzymatická disociace, 0,25% trypsin, 0,05% Dnasa	PKH26	PKH26
2010	Nóbrega <i>et al.</i>	Danio pruhované ( <i>Danio rerio</i> )	Dospělý jedinec (sexuálně zralý samec)	Danio pruhované ( <i>D. rerio</i> )	2–3 týdny po transplantaci (sexuálně zralý samec) 3–4 týdny po transplantaci (sexuálně zralá samice)	Busulfan 30 nebo 40 mg/kg teplota vody 35°C  po dobu 1 týdne	Spg. enzymatická disociace 0,2% kolagenáza, 0,12% disipáza	GFP	59-brom-29-deoxyuridin (BrdU) rozpuštěný ve vodě (4 mg/ml) po dobu 4–10h

**Tabulka Ib: Přehled alogenních transplantací provedených u ryb.**

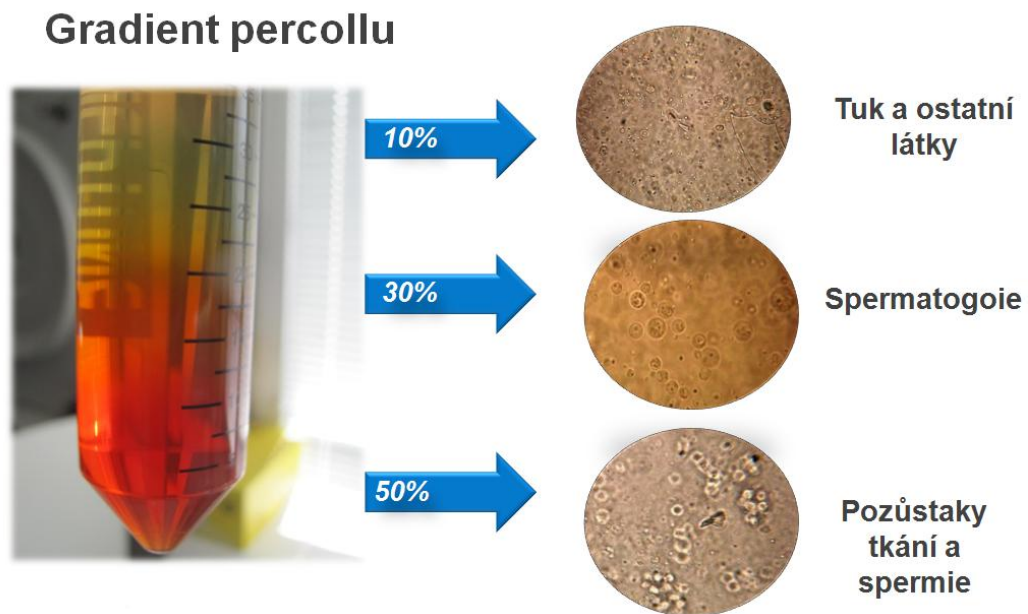
Rok	Autor	Donor	Věk, pohlaví dárce	Recipient	Věk, pohlaví příjemce	Použitá sterilizace recipienta	Izolace zárodečných buněk	Identifikace zárodečných buněk	Identifikace chimér
2010	Kawasaki <i>et al.</i>	Danio pruhované ( <i>D. rerio</i> )		Danio pruhované ( <i>D. rerio</i> )	Juvenil 5-8 týdnů po sterilizaci	Hybridizace	—	Vasa-GFP	59-brom-29-deoxyuridin (BrdU) rozpuštěný ve vodě (4 mg/ml) po dobu 4–10h
2010	Lacerda <i>et al.</i>	Tilapie nilská ( <i>O. niloticus</i> )-červeně zbarvená tilapie	Dospělý jedinec (samec)	Tilapie nilská ( <i>O. niloticus</i> ), Chitralada tilapie (divoce zbarvená)	Dospělý jedinec (samec)	Busulfan 15 nebo 18 mg/kg, teplota vody 35°C po dobu 2 týdnů	Percoll gradient	PKH26	PKH26, různé fenotypy, různé druhy tilápií
2011	Wong <i>et al.</i>	Danio pruhované ( <i>D. rerio</i> )	3 měsíce (samice)	Danio pruhované ( <i>D. albolineatus</i> ) hybrid	Embryo ve fázi blastuly	Hybridizace	Percoll gradient	vasa-DsRed2; EGFP-bactin	vasa-DsRed2; EGFP-bactin
2012	Morita <i>et al.</i>	Kranas japonský ( <i>S. quinquerediata</i> )	10 měsíců (sexuálně nezralý)	Kranas japonský ( <i>S. quinquerediata</i> )	8 denní larva	—	—	PKH26	PKH26, ISH (vasa)
2013	Farlora <i>et al.</i>	Tilapie nilská ( <i>O. niloticus</i> )	5–12 měsíců	Tilapie nilská ( <i>O. niloticus</i> )	Larva	—	—	medaka $\beta$ -actin/(EGFP)	PKH26, DAPI, DNA pro PCR
2013	Lacerda <i>et al.</i>	Tilapie nilská ( <i>O. niloticus</i> )	Buněčná kultura z dospělého jedince	Tilapie nilská ( <i>O. niloticus</i> )	Dospělý jedinec (sexuálně zralý samec)	Busulfan	Buněčná kultura (SG), Percoll gradient	Imunologické barvení PKH26-GL	PKH26 – Gfra1



**Tabulka II: Přehled xenogenních transplantací provedených u ryb.**

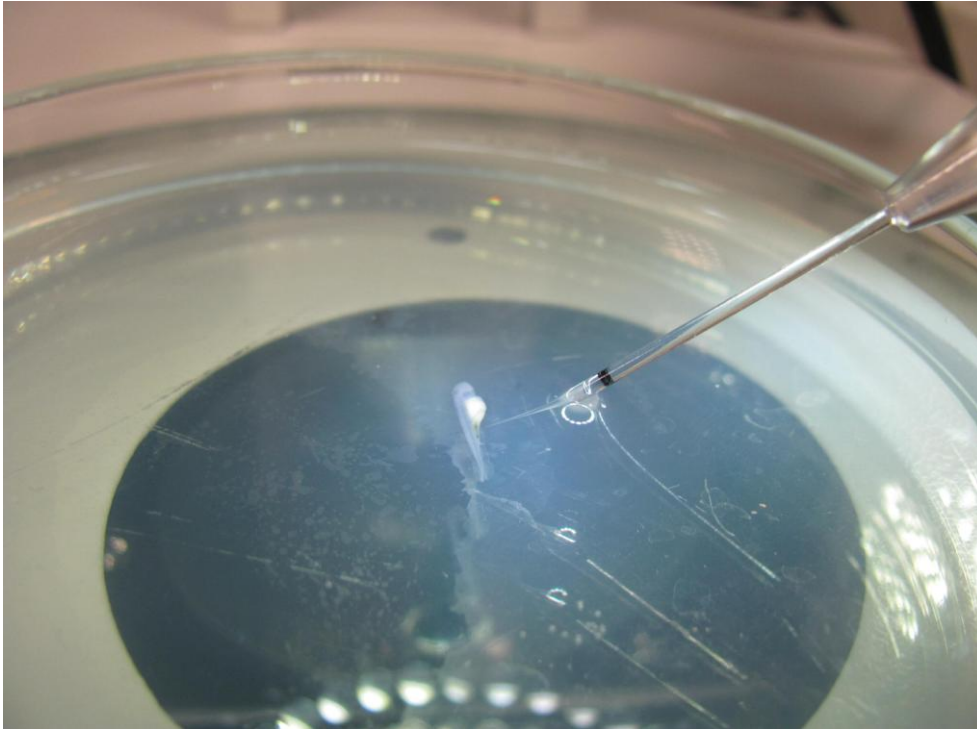
Rok	Autor	Donor	Věk, pohlaví dárce	Recipient	Věk, pohlaví příjemce	Použitá sterilizace recipienta	Izolace zárodečných buněk	Identifikace zárodečných buněk	Identifikace chimér
2007	Okutsu <i>et al.</i>	Pstruh duhový ( <i>O. mykiss</i> )	Dospělý jedinec	Losos masu ( <i>O. masou</i> )	embryo	Triploidizace	—	Vasa-GFP	Vasa-GFP, analýza RAPD
2008	Okutsu <i>et al.</i>	Pstruh duhový ( <i>O. mykiss</i> )	Dospělý jedinec	Losos masu ( <i>O. masou</i> )	34 denní po sterilizaci	Triploidizace	—	PCR, GFP - specifické primery	PCR, GFP - specifické primery
2009	Majhi <i>et al.</i>	Gavúnovec argentinský ( <i>Odontesthes bonariensis</i> )	4–5 měsíců (sexuálně nezralý)	Gavúnovec patagonský ( <i>O. hatcheri</i> )	jednoletý jedinec (sexuálně zralý samec)	Busulfan 40 mg/kg, teplota vody 25°C po dobu 4 týdnů	Spg. enzymatická disociace; 0,5% trypsin, 5% fetální bovinní sérum a 1mM Ca2+ po dobu 2 hodin při 22°C	Trypan blue	Trypan blue
2010	Higuchi <i>et al.</i>	Kranas japonský ( <i>S. quinquerediata</i> )	(sexuálně zralý samec 722g)	( <i>N. mitsukurii</i> )	Larva 4mm	—	—	PKH26, vasa	PKH26, genotypová (vasa), (anti-PCNA)
2010	Yazawa <i>et al.</i>	( <i>N. mitsukurii</i> )	3 měsíce (samec)	Makrela japonská ( <i>Scomber japonicus</i> )	Larva	—	DAPI	PKH26	PKH26, ISH (vasa)
2011	Higuchi <i>et al.</i>	Kranas japonský ( <i>S. quinquerediata</i> )	Samec	( <i>N. mitsukurii</i> )	Larva	—	Spg. enzymatická disociace; 1ml 0,25% trypsin, 10ml/ml kolagenázy H, 5% fetální bovinní sérum, 0,05% DNAsy I po dobu 3 hodin při 20°C	PKH26	PKH26
2013	Yazawa <i>et al.</i>	Pacifický tuňák obecný ( <i>Thunnus orientalis</i> )	Sexuálně nezralý jednoroký jedinec vážící cca 10kg	Makrela japonská ( <i>S. japonicus</i> )	Larva	—	—	—	—
2015	Pšenička <i>et al.</i>	Jeseter sibiřský ( <i>A. baerii</i> )	Sexuálně nezralý 4roční jedinec	Jeseter malý ( <i>A. ruthenus</i> )	Larva	—	Percoll gradient	PKH26, FITC-dextran	PKH26, FITC-dextran

## 7.2. Příloha 2

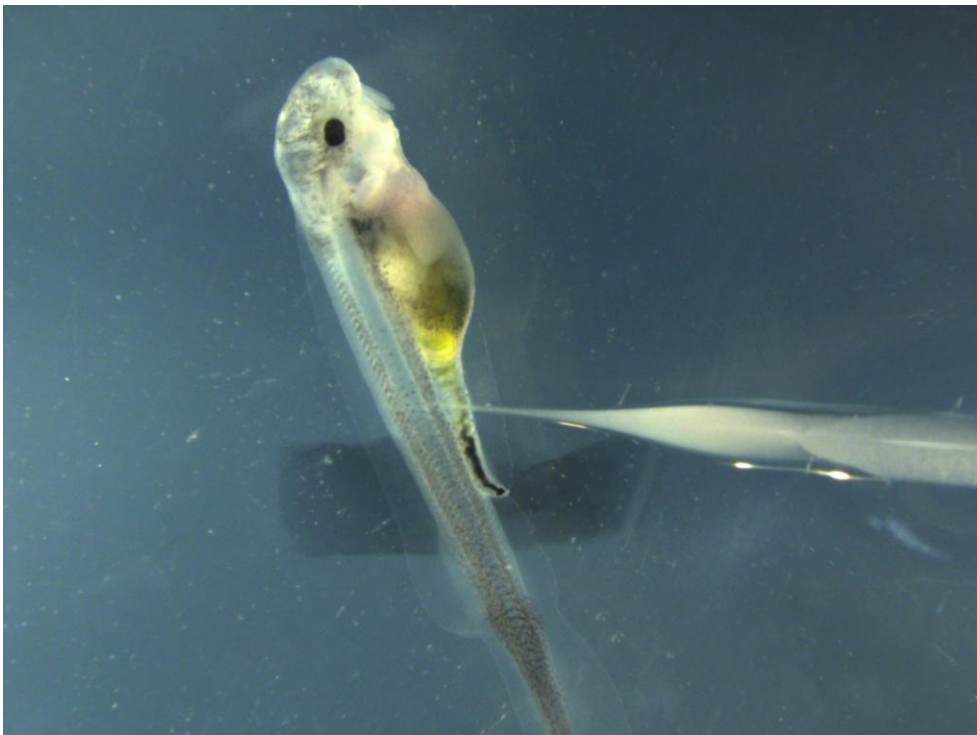


Obr. 2: Názorné schéma separace SG pomocí Percoll gradientu.

### 7.3. Příloha 3



Obr. 3: Transplantace spermatogonií do embrya jesetera malého (*A. ruthenus*) (Foto: Petr Dobrovolný).



Obr. 4: Detailní pohled na transplantaci spermatogonií do genitální rýhy jesetera malého (*A. ruthenus*) (Foto: Petr Dobrovolný).



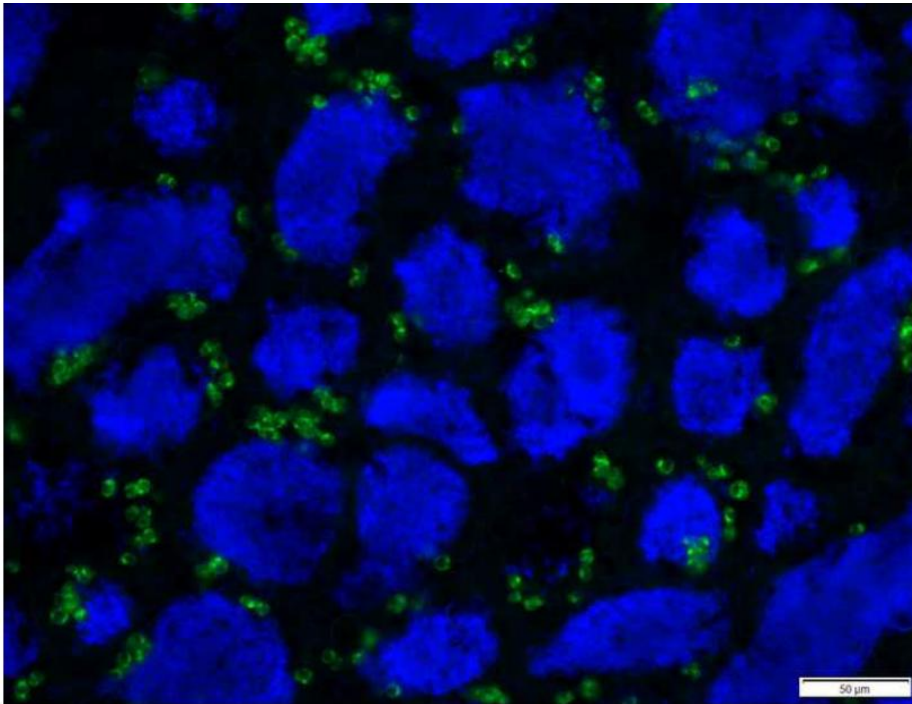
Obr. 5: Micromanipulátor M-152 (Narishige, Japonsko) a microinjektor CellTram Vario (Eppendorf, Německo) a fluorescenční stereomikroskop M165FC (Foto: Petr Dobrovolný).



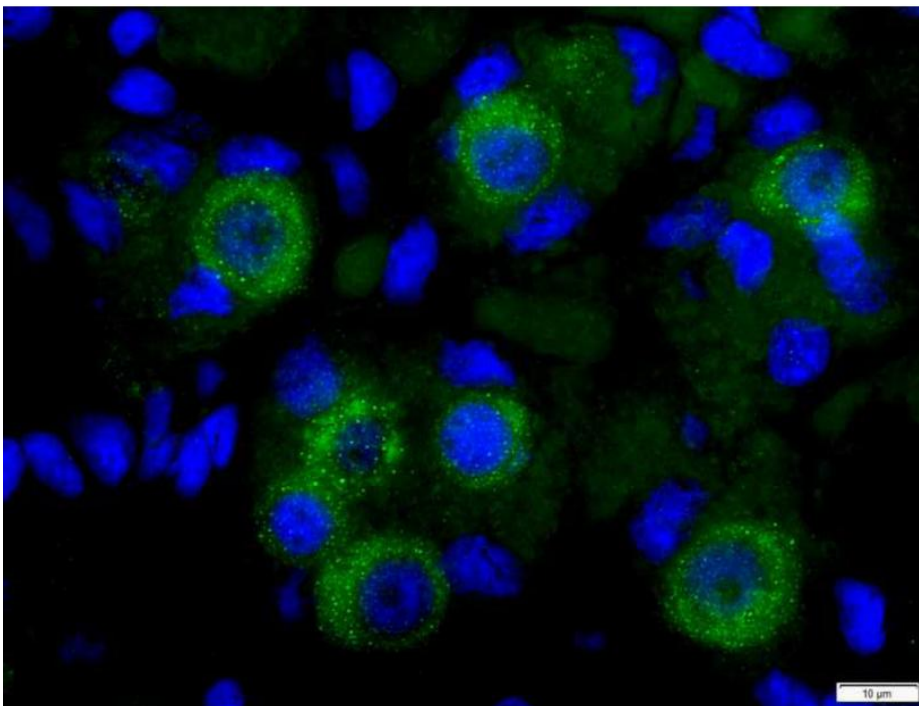
Obr. 6.: Testes (T) a ovária (O) jesetera sibiřského (*A. baerii*) ve druhé fázi zralosti (velikost 90 mm) (Foto: Martin Pšenička)



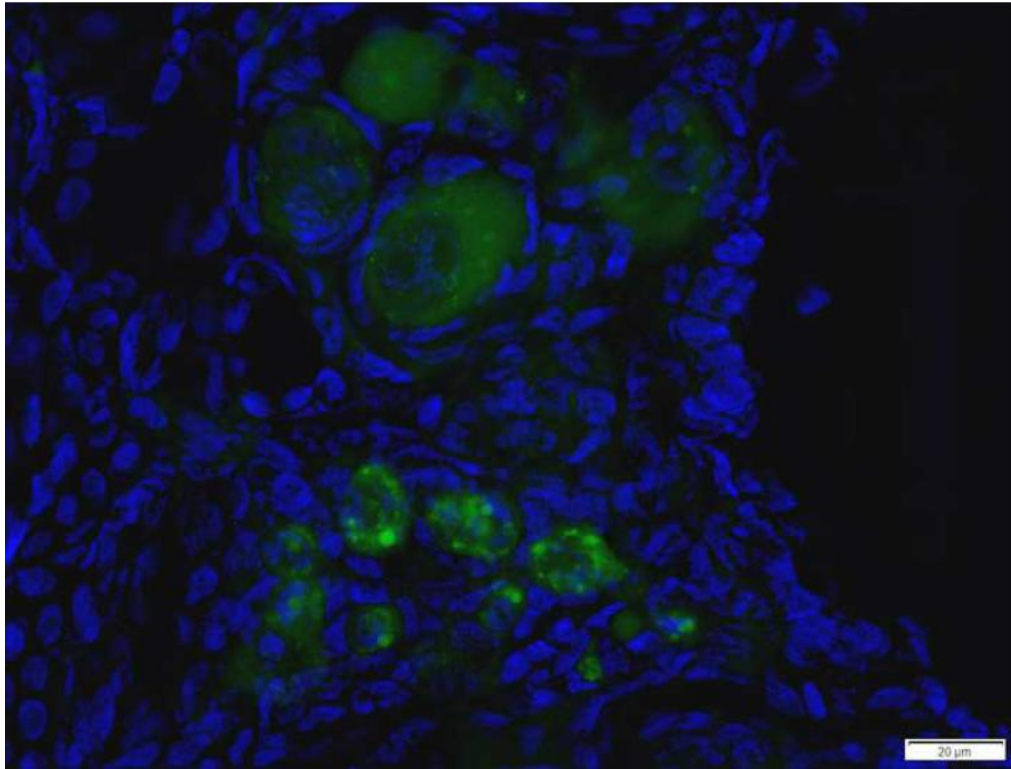
#### 7.4. Příloha 4



Obr. 7a: Výsledek imunohistochemických analýz provedených u varlat ve čtvrté fázi vývoje, modrá barva (DAPI) označuje jádra buněk, zelená protilátka oznažuje zárodečné buňky (Foto: Martin Pšenička).

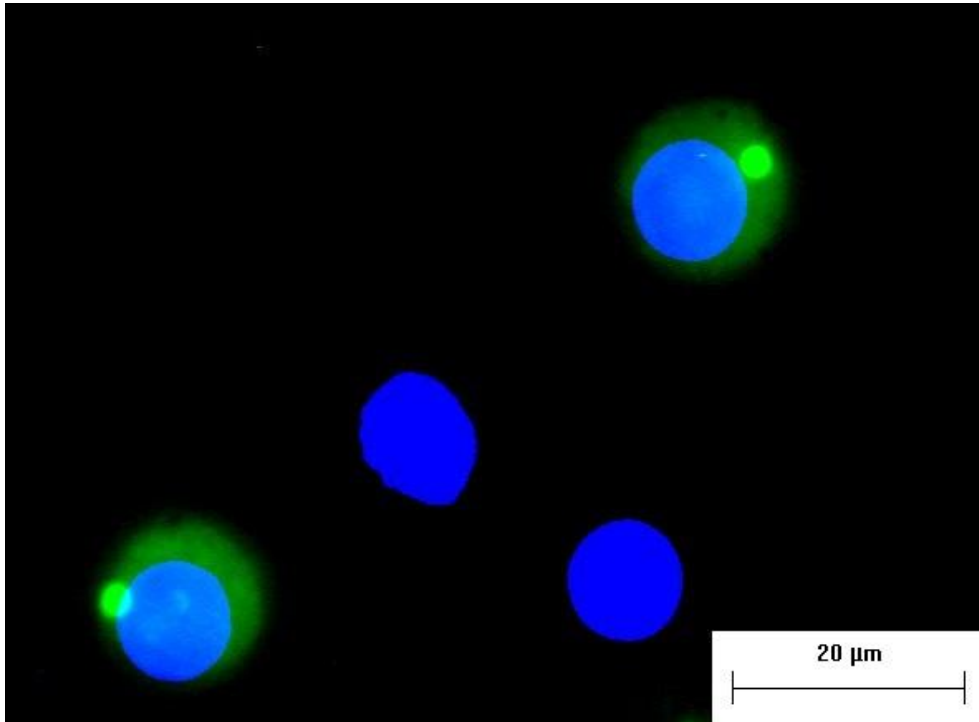


Obr. 7b: Výsledek imunohistochemických analýz provedených u varlat v druhé fázi vývoje, modrá barva (DAPI) označuje jádra buněk, zelená protilátka oznažuje zárodečné buňky (Foto: Martin Pšenička).

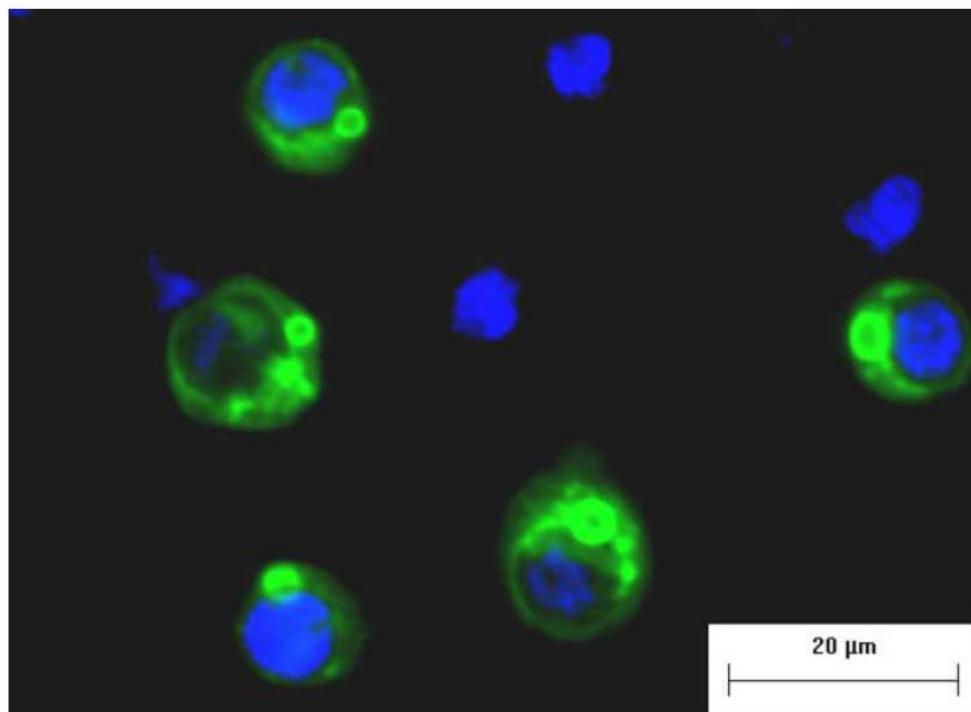


Obr. 7c: Výsledek imunohistochemických analýz provedených u ovárií v druhé fázi vývoje, modrá barva (DAPI) označuje jádra buněk, zelená protilátka označuje zárodečné buňky (Foto: Martin Pšenička).

## 7.5. Příloha 5

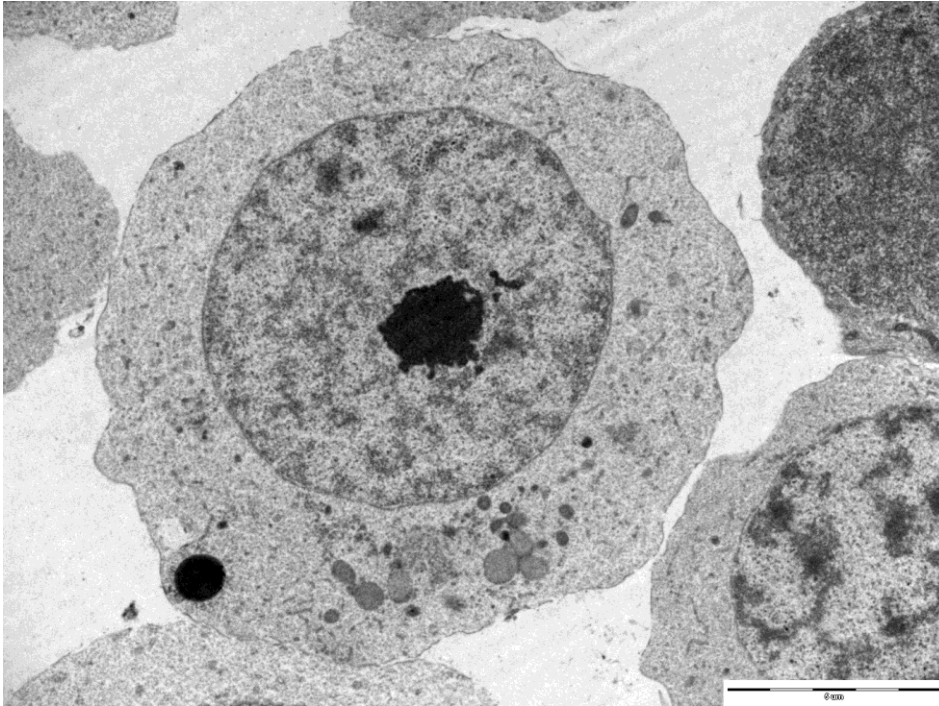


Obr. 9a: Suspenze testikulárních buněk u jesetera sibiřského (*A. baerii*) (Foto: Martin Pšenička).

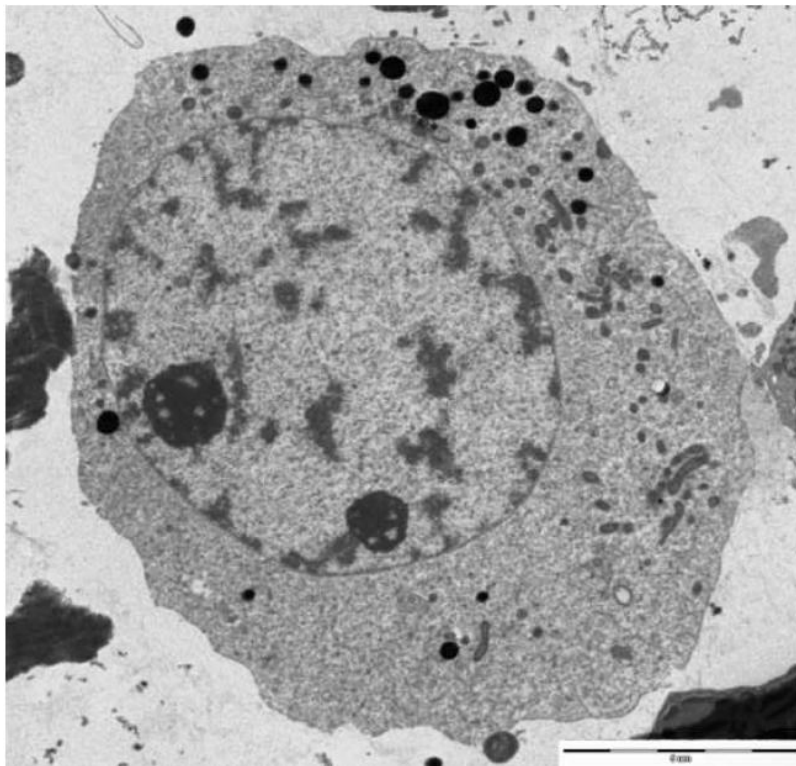


Obr. 9b: Suspenze ovariálních buněk u jesetera sibiřského (*A. baerii*) (Foto: Martin Pšenička).

## 7.6. Příloha 6



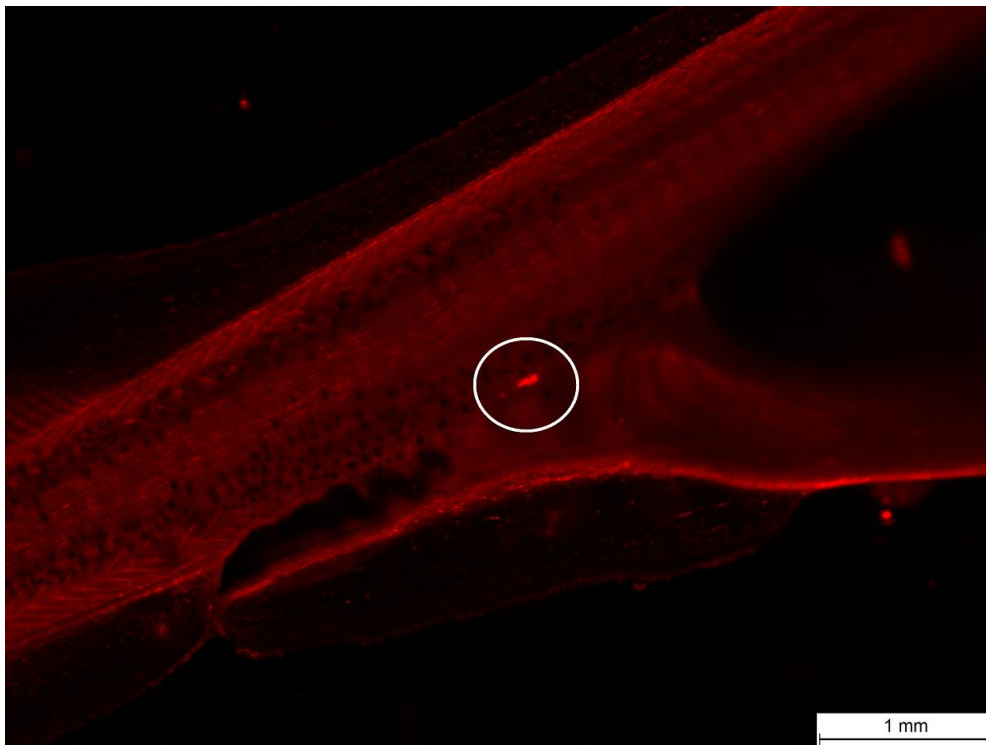
Obr. 10a: Řez spermatogonií u jesetera sibiřského (*A. baerii*) pomocí transmisní elektronové mikroskopie (Foto: Martin Pšenička).



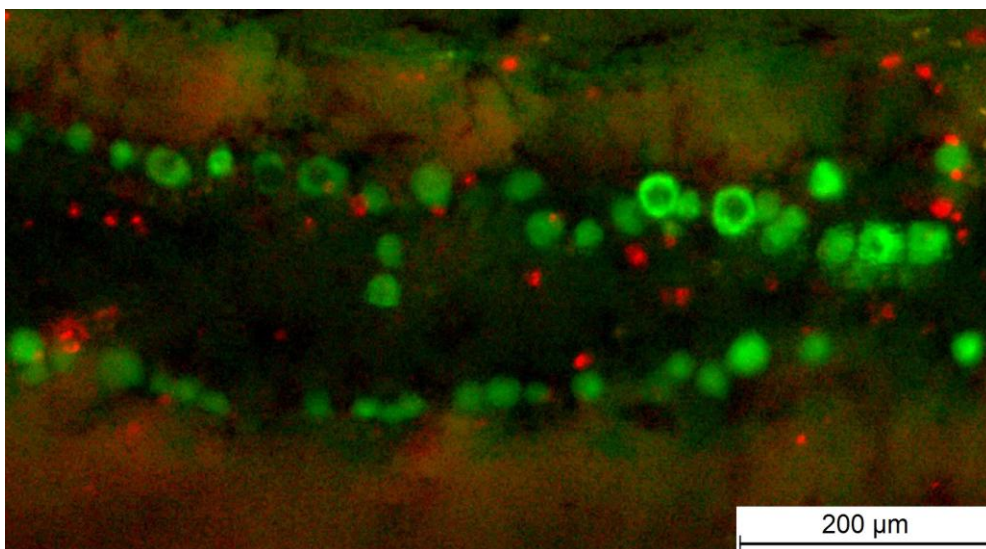
Obr. 10b: Řez oogonií u jesetera sibiřského (*A. baerii*) pomocí transmisní elektronové mikroskopie (Foto: Martin Pšenička).



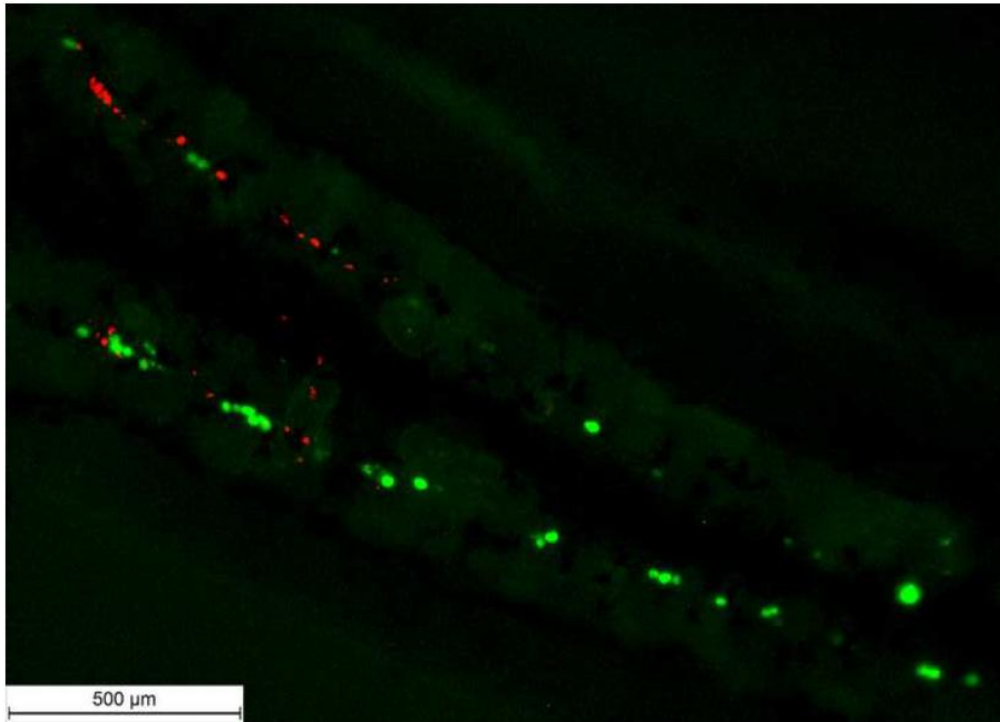
## 7.7. Příloha 7



Obr. 11a: Larvy jesetera malého (*A. ruthenus*) s červeně značenou transplantovanou spermatogonií jesetera sibiřského (*A. baerii*) po šesti dnech od transplantace (Foto: Martin Pšenička).



Obr. 11b: Larvy jesetera malého (*A. ruthenus*) se zeleně značenými endogenními PGC a červeně značenými transplantovanými spermatogoniemi jesetera sibiřského (*A. baerii*) po třiceti dnech od transplantace (Foto: Martin Pšenička).



Obr. 11c: Larvy jesetera malého (*A. ruthenus*) se zeleně značenými endogenními PGC a červeně značenými transplantovanými spermatogoniemi jesetera sibiřského (*A. baerii*) po padesáti dnech od transplantace (Foto: Martin Pšenička).

## 8. Seznam zkratk

DNA	deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina
EGFP	enhanced green fluorescent protein, vylepšený zelený fluorescenční protein
F1	první generace potomstva
GFP	green fluorescent protein, zelený fluorescenční protein
HBSS	Hankův vyvážený solný roztok
L-15	Leibovitzovo médium
OG	Oogonia, oogonie
PBS	phosphate-buffered saline, fosfátový pufr
PGC	primordial germ cell, primordiální gonocyty
PKH26	červené fluorescenční barvivo pro značení buněčných membrán
SG	spermatogonia , spermatogonie

## 9. Abstrakt

### **Záchrana kriticky ohrožených druhů ryb pomocí manipulace se spermatogoniemi a oogoniemi**

Transplantační experimenty popsané v této práci mohou napomoci ke zkrácení generačního intervalu u dlouho dozrávajících ohrožených druhů ryb a k jejich efektivnější reprodukci. Dále pak je možné separované spermatogonie (SG) a oogonie (OG) uchovávat pomocí kryoprezervace v tekutém dusíku. Zakonzervujeme tak, jak paternální, tak i maternální DNA a nedojde k ochuzení genofondu ohrožených druhů ryb o maternální část. Z toho důvodu, že při uchovávání zralých gamet můžeme zamrazit pouze spermie. Jikry a embrya by zamrazování nepřežila. Popsané metody budou v budoucnu uplatněné k efektivnější záchraně kriticky ohrožených jeseterů pomocí transplantace jejich zárodečných buněk do jesetera malého (*Acipenser ruthenus*). Metody mohou být vhodné i pro aplikaci na jiné druhy ohrožených ryb při nalezení vhodného recipienta. Jako příklad lze z našich druhů ryb uvést úhoře říčního (*Anguilla anguilla*).

Jako modelové organizmy byly použity jeseter sibiřský (*Acipenser baeri*) a jeseter malý (*Acipenser ruthenus*) u jesetera sibiřského byla použita technika enzymatické disociace, třídění zárodečných buněk pomocí koncentrace Percoll gradientu a transplantace jeseteřích SC a OG. Výsledky ukázaly, že použití 0,3% trypsinu v PBS je pro disociaci SG a OG optimální, protože toto médium disociovalo nejvyšší počet buněk bez snížení jejich životaschopnosti. Odseparování raných stádií zárodečných buněk bylo úspěšně dosaženo oddělením v 10 až 30% Percoll gradientu za pomoci centrifugace. Po transplantaci bylo v případě SG i u OG prokázáno, že kolonizovaly genitální rýhy hostitele. Recipient se stal chimérou zárodečné linie, která může po celý svůj život produkovat gamety dárce.

**Klíčová slova:** Kriticky ohrožený druh, spermatogonie, oogonie, transplantace, chiméra, primordiální gonocyty, donor, recipient

## **Abstract**

### **The rescue of critically endangered fish species through manipulation with spermatogonia and oogonia**

The transplant experiments described in this work may help to shorten the generation interval for long maturing endangered fish species and their more effective reproduction. Further, it is possible to preserve the separated spermatogonia and oogonia using a cryopreservation in liquid nitrogen. We conserve both paternal and maternal DNA and the gene pool of endangered fish species will not be depleted of maternal part. It's because we can freeze only sperm in the preservation of mature gametes. Fish eggs and embryos would not survive freezing. The described methods will be applied in the future to more effective rescue of critically endangered sturgeons by the transplantation of their germ cells into a Sterlet (*Acipenser ruthenus*). These methods can be suitable for application on other species of endangered fish in case of finding an appropriate recipient. As an example of our fish species is a European eel (*Anguilla Anguilla*).

The Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) and the Sterlet (*Acipenser ruthenus*) were used as model organisms. For Siberian sturgeon the enzymatic dissociation technique, sorting of germ cells using Percoll gradient concentration and transplantation of sturgeon spermatogonia and oogonia were used. The results showed that the use of 0.3% of trypsin in PBS is optimal for dissociation of spermatogonia and oogonia, because this medium was dissociating the highest number of cells without reducing their viability. The separation of the early stages of germ cells has been successfully achieved by segregation in 10 to 30% of Percoll gradient with the help of centrifugation. After transplantation it was proved in spermatogonia as well in oogonia that they colonized the genital ridges of the host. The recipient became a chimera of a germ line, which can produce donor gametes throughout his life.

**Keywords:** Critically endangered species, spermatogonia, oogonia, transplantation, chimera, primordial gonocytes, donor, recipient