

ČESKÁ ZEMĚDĚLSKÁ UNIVERZITA V PRAZE



Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín

**Moderní biotechnologické metody umožňující
dlouhodobé uchování drůbeží genetické informace**

Disertační práce

Školitel: prof. MVDr. Ing. František Jílek, DrSc.

Školitel specialista: Ing. Pavel Trefil, DrSc.

Doktorand: Ing. Barbora Benešová

2014

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem disertační práci na téma Moderní biotechnologie umožňující dlouhodobé uchování drůbeží genetické informace vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v příloženém seznamu literatury.

V Rakovníku dne: 10.10. 2014

podpis autora práce

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli prof. MVDr. Ing. Františkovi Jílkovi, DrSc. a svému konzultantovi Ing. Pavlu Trefilovi, DrSc. za odborné vedení při řešení disertační práce. Dále děkuji kolegům z oddělení VaV ze společnosti BIOPHARM za vstřícnost, cenné rady a připomínky a své rodině za podporu během studia.

Obsah

1. ÚVOD.....	2
2. PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU POZNÁNÍ.....	4
2.1 Testikulární buňky ptáků.....	4
2.2 Identifikace kmenových spermatogoniálních buněk.....	5
2.3 Transplantace testikulárních buněk.....	8
2.4 Kryokonzervace testikulárních buněk.....	12
3. VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE.....	13
4. MATERIÁL A METODY.....	14
4.1 Kryokonzervace a transplantace testikulárních buněk.....	14
4.1.1 Pokusná zvířata.....	14
4.1.2 Izolace a kryokonzervace testikulárních buněk.....	14
4.1.3 Viabilita testikulárních buněk.....	15
4.1.4 Transplantace testikulárních buněk.....	15
4.1.5 Ověření účinnosti transplantace zamrazených testikulárních buněk.....	15
4.2 Transplantace vybraných samčích zárodečných buněk.....	16
4.2.1 Pokusná zvířata.....	16
4.2.2 Příprava rekombinantního kuřecího GFR α -1 proteinu.....	17
4.2.3 Příprava polyklonálních protilátek.....	17
4.2.4 Průtoková cytometrie.....	18
4.2.5 Izolace a selekce a transplantace GFR α -1 pozitivních buněk.....	18
4.2.6 Ověření účinnosti transplantace GFR α -1 pozitivních buněk.....	18
5. VÝSLEDKY.....	19
5.1 Kryokonzervace a transplantace testikulárních buněk.....	19
5.1.1 Viabilita buněk po izolaci a kryokonzervaci.....	19
5.1.2 Obnova spermatogeneze u příjemců.....	19
5.1.3 Ověření účinnosti transplantace zamrazených testikulárních buněk.....	20
5.2 Transplantace vybraných samčích zárodečných buněk.....	20
5.2.1 Detekce GFR α -1 pozitivních buněk.....	20
5.2.2 Obnova spermatogeneze u příjemců.....	20
5.2.3 Ověření účinnosti transplantace GFR α -1 pozitivních buněk.....	21
6. DISKUZE.....	21
6.1 Kryokonzervace a transplantace testikulárních buněk.....	21
6.2 Transplantace vybraných samčích zárodečných buněk.....	24
7. ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ.....	26
8. SEZNAM LITERATURY.....	29
9. PŘÍLOHY.....	39

1. ÚVOD

Během posledních desetiletí se výrazně zvýšila produkce hospodářských zvířat. S vývojem reprodukčních biotechnologií, moderních šlechtitelských postupů a chovem vysokoužitkových populací je spojena ztráta genetické diverzity u většiny druhů hospodářských zvířat, a to jak mezi plemeny či liniemi, tak uvnitř nich. Původní plemena jsou často nahrazována globálně používanými vysoce produktivními hybridními liniemi. Plemena s nižší užitkovostí jsou často chována pouze lokálně a v malých populacích. V důsledku malé chovné základy trpí tato plemena inbreedingem, dědičnými chorobami, malformacemi či dysfunkcemi a klesá genetická diverzita. Ta může být velmi nízká i u komerčně chovaných plemen či linií, ačkoli jsou zastoupena v obrovských počtech. Ovšem k reprodukci je mnohdy používáno jen několik málo samců (Woelders et al., 2006).

Odvětví chovu drůbeže je nejrychleji se rozvíjející ze všech odvětvích chovu hospodářských zvířat. Rozvoj ve šlechtění, krmení a ustájení umožnil nárůst v produkci a užitkovosti (Hoffmann, 2009). Neustálá selekce na znaky masné užitkovosti u většiny druhů drůbeže vede ke snížení účinnosti přirozeného páření, k poklesu kvality spermií a reprodukčního potenciálu (Lukaszewicz et Kruszynski, 2003). Genetická diverzita v chovech drůbeže rapidně klesá kvůli rychlému úbytku mnoha malých populací a vysoké specifitě vyšlechtěných komerčních linií (Blesbois, 2007).

V současné době je 13 % ptačích druhů ohroženo vyhubením (IUCN, 2014). Pro záchranu ohrožených druhů a udržení genetické variability se nabízí dva základní přístupy. Prvním z nich je uchování *in situ*, tedy v první řadě ochrana životního prostředí, dále chov původních plemen drůbeže či vzácných druhů ptáků v zajetí s cílem jejich reintrodukce zpět do přírody. Ovšem dlouhotrvající izolace malých populací, nepřírozené podmínky nebo nekompatibilita párů může způsobit snížení variability a heterozygotnosti. Vzdálenost mezi jednotlivými zachovnými centry znesnadňuje výměnu zvířat. Alternativou je uchování genetické variability *ex situ*. Pro tyto účely jsou zakládány genové banky, které umožňují nejen uchování vzorků pro případ nějaké neočekávané události, jako byla například epidemie ptačí chřipky, ale i výměnu vzorků mezi jednotlivými centry. Výměna a transport zamrazených vzorků nejsou tak náročné jako výměna a transport zvířat, odpadá stresování zvířat a předchází se možným rizikům při přenosu nemocí (Jalme et al., 2003).

Pro *ex situ* uchování genových zdrojů existuje v současnosti několik možností. Všechny využívají metodu kryokonzervace, tedy uchování buněk či tkání při velmi nízkých teplotách. Nejčastěji se používá kryokonzervace ejakulátu. Ačkoli spermie přežívají *in vivo*

v těle samice několik dnů až týdnů (Benešová et Trefil, 2012 – příloha 4), uchovávání spermií *in vitro* při teplotách nad 0°C je omezeno. Spermie kohoutů si v tomto stavu udržují schopnost oplodnit vajíčko asi 60 minut, při použití ředidel 24-48 hodin, ovšem s každou hodinou klesá kvalita ejakulátu, zejména počet motilních a mobilních spermií. Kryokonzervace ejakulátu v tekutém dusíku umožňuje uchovat oplozeníschopnost spermií prakticky po neomezeně dlouhou dobu. Přes intenzivní snahu vyvinout účinné postupy pro mrazení ptačích spermií, uspokojivých výsledků bylo dosaženo teprve koncem 20. století, zejména u kohoutů (Tselutin et al., 1999, Chalah et al., 1999). Avšak ty samé postupy aplikované na jiných druzích nebo i jiných plemenech mnohdy selhávají nebo jsou jen velmi málo účinné. Úspěch kryokonzervace ptačích spermií je velmi variabilní a závisí na mnoha faktorech, jako na druhu, příslušnosti k plemeni nebo specifitě linií i na konkrétních jedincích v hejnu (Blanco et al., 2000; Massip et al., 2004; Fulton, 2006; Long, 2006; Blesbois et al., 2007). Podrobně se kryokonzervací ejakulátu zabývá práce Benešová et Trefil (2014) – příloha 2.

Další možnosti zahrnují dlouhodobé uchování oocytů nebo embryí. Na rozdíl od savců je u ptáků použití těchto metod limitováno velikostí oocytů, vysokým obsahem lipidů (Massip et al., 2004; Hiemstra et al., 2005) a nesnadným přístupem k zygotě a oocytům (Sang, 2004). Alternativou je dlouhodobé uchovávání embryonálních buněk – blastodermálních buněk nebo primordiálních zárodečných buněk (Naito et al., 1994; Kino et al., 1997; Tajima et al., 1998). Tyto postupy nejsou ale dosud dostatečně účinné a pro účely záchovných programů jsou příliš nákladné (Petitte, 2006; Blesbois et Brillard, 2007).

Řešením může být kryokonzervace samčích spermatogoniálních buněk a jejich následná autologní, homologní nebo heterologní transplantace. Na rozdíl od dlouhodobého uchovávání spermií, kterému se vědci intenzivně věnují již několik desetiletí, spermatogoniální buňky a zejména jejich dlouhodobé uchovávání je poměrně novou, nicméně slibnou strategií pro uchování genových zdrojů.

2. PŘEHLED O SOUČASNÉM STAVU POZNÁNÍ

2.1 Testikulární buňky ptáků

Testikulární buňky není pojem, který by se běžně vyskytoval v učebnicích. V následující části práce je toto slovní spojení často zmiňováno, a proto je mu zde věnována pozornost. Jak lze z názvu odvodit, jedná se o všechny buňky, které lze najít ve varlatech, tedy v testes. Stejně jako u savců dělíme tyto buňky na zárodečné a nezárodečné neboli podpůrné buňky. U ptáků existuje ale několik rozdílů, zejména v procesu spermatogeneze. Celý proces vzniku zralé spermie z kmenové spermatogonie je daleko kratší než u savců. Zatímco u myši trvá spermatogeneze 35 dní, u potkanů 52 dnů, u člověka 64 dní (Heller et Clermont, 1963; Russel et al., 1990; McCarrey, 1993; Brinster et Zimmermann, 1994), u kohouta, krocana nebo kačera je to 13-14 dní (De Reviers, 1968; Marchand et al., 1977; Noirault et al., 2006), u japonské křepelky jen 12 dní (Lin et Jones, 1992). Během spermatogeneze u ptáků dochází totiž k menšímu počtu mitotických dělení (Jones et Lin, 1993).

Popis jednotlivých typů spermatogonií u ptáků nebyl dlouho k dispozici, až Lin et Jones (1992) identifikovali u japonských křepelk 4 typy spermatogonií: typ A_d , A_{p1} , A_{p2} a B spermatogonie. U krocánů byly identifikovány pouze 3 typy: A_d , A_p a B spermatogonie (Bakst et al., 2007). A_d spermatogonie ptáků (dark typ A spermatogonie) jsou považovány za kmenové spermatogonie, protože sdílí vlastnosti zárodečných kmenových buněk savců, konkrétně se savčí A_s spermatogonií (Lin et Jones, 1992; Bakst et al., 2007). To znamená, že pouze z této buňky vznikají přes složitý proces spermatogeneze zralé spermie. A_d buňky jsou malé eliptické buňky s tmavým jádrem. Nacházejí se u bazální membrány semenotvorného epitelu. Jedná se o nejméně početnou skupinu buněk, vyskytují se izolovaně, ne ve skupinách (Bakst et al., 2007). Mitotickým dělením jednak obnovují populaci A_d spermatogonií a také produkují A_p spermatogonie. A_{p1} spermatogonie jsou velké ovoidní buňky, slabě se barvící a obsahující relativně málo organel. A_{p2} spermatogonie obsahují mnoho organel a jsou spojené se sousedními buňkami cytoplasmatickými můstky. B spermatogonie jsou ovoidní buňky střední velikosti, chromatin tvoří velké nepravidelné shluky. Cytoplasma obsahuje četné organely a sousední buňky jsou také spojené cytoplasmatickými můstky. Ani A_p ani B spermatogonie nejsou spojené s bazální membránou (Lin et Jones, 1992; Bakst et al., 2007). Populace B spermatogonií předchází primárním spermatocytům, které již vstupují do prvního

redukčního dělení – meiózy. Primární spermatocyty jsou největší zárodečné buňky ve varlatech, jejich životnost v rámci procesu spermatogeneze je poměrně dlouhá. Oproti tomu sekundární spermatocyty, které vznikají po prvním redukčním dělení, mají ve vztahu k primárním spermatocytům velmi krátkou životnost (Jones et Lin, 1993). Výsledkem druhého redukčního dělení jsou spermatidy, které musí podstoupit složitý proces diferenciaci ve spermie.

Na rozdíl od savčích spermií jsou ptačí spermie již po opuštění vývodných žláz zralé a schopné oplodnit vajíčko (Howarth, 1983). Hlavička ptačích spermií je na rozdíl od savčích spermií cylindrická, v průměru ne o moc širší než bičík - cca 0,5 μ m (Thurston et Hess, 1987). Obsahuje velmi málo cytoplazmy, a tedy menší schopnost pronikání kryoprotektiv dovnitř buňky, což může být jedním z důvodů, proč ptačí spermie nepřežívají kryokonzervaci tak dobře jako spermie některých savců (Donoghue et Wishart, 2000). Ptačí spermie mají relativně velký povrch cytoplasmatické membrány (Lake, 1984; Etches, 1996) a velmi dlouhý bičík – 90-100 μ m (Thurston et Hess, 1987).

Mezi podpůrné testikulární buňky patří Leydigovy (intersticiální) buňky a Sertoliho buňky. Nejdůležitější funkcí Leydigových buněk je produkce androgenů, zejména testosteronu. Spolu se Sertoliho buňkami se Leydigovy buňky podílejí na přeměně primordiálních zárodečných buněk (PGC) do spermatogoniálních buněk, které pak po celý život podporují. Sertoliho buňky se podílejí na regulaci spermatogeneze, na syntéze výživných látek, i na kontrole počtu a typu zárodečných buněk (Thurston et Korn, 2000). Sertoliho buňky dále produkují některé růstové faktory, kterými stimulují nebo inhibují obnovu, diferenciaci a další vývoj všech zárodečných buněk (Skinner, 1991; Jegou, 1993). Obnova a diferenciaci spermatogoniálních buněk závisí na tom, jak blízko jsou ve spojení se Sertoliho buňkami v semenotvorném epitelu (Fritz, 1994). Sertoliho buňky připomínají makrofágy, fagocytují zbytky cytoplazmy při vývoji spermatid ve zralé spermie (Cooksey et Rothwell, 1973; Lin et Jones, 1992; Thurston et Korn, 2000).

Ve varleti se dále nacházejí peritubulární neboli myodní buňky, makrofágy, lymfocyty, krevní cévy a u některých ptáků i pigmentové buňky (Černý, 2005; Hedger, 2012).

2.2 Identifikace kmenových spermatogoniálních buněk

Pouze kmenové spermatogoniální buňky jsou schopné zahájit spermatogenezi a produkci zralých plně funkčních spermií. Ačkoli byly zaznamenány úspěchy i při

transplantacích testikulárních buněk s neznámým počtem kmenových buněk jak u savců (Brinster et Avarbock, 1994; Kanatsu-Shinohara et al., 2003b; Herrid et al., 2009), ryb (Majhi et al., 2009) i ptáků (Trefil et al., 2006; Song et Silversides, 2007a), přesná identifikace a izolace obohacené populace zárodečných kmenových buněk může významně ovlivnit účinnost transplantací a obnovu spermatogeneze v semenotvorném epitelu příjemce.

Jak již bylo zmíněno výše, kmenové spermatogonie jsou nejméně početnou buněčnou populací ve varlatech. Uvádí se, že u myši je z celkového množství zárodečných buněk pouze 0,01 až 0,03 % kmenových buněk (Meistrich et Beek, 1993; Tegelenbosch et Rooij, 1993). Jejich identifikace na základě morfologických vlastností je sice možná, ale pouze na zafixovaných preparátech. Alespoň částečnou purifikaci populace savčích zárodečných buněk u čerstvých vzorků lze provést například elucí při centrifugaci (Meistrich et al., 1978); separací v hustotním gradientu (Percoll) (Van Pelt et al., 1996; Izadyar et al., 2002), magnetickou separací buněk (MACS) (Van der Wee et al., 2001), separací pomocí lektinů (Van Pelt et al., 1996;) nebo pomocí monoklonálních protilátek (Van Pelt et al., 2002). Účinnost purifikace závisí nejen na zvolené metodě izolace, ale také na množství spermatogoniálních buněk ve varlatech. Z tohoto hlediska se jeví jako výhodnější odebírat buňky od zvířat těsně po narození nebo ještě před zahájením puberty, kdy se ve varlatech nachází pouze počáteční stádia spermatogeneze (Honaramooz et al., 2002; 2003a). Trefil et al (2006) ale vliv věku dárce buněk zpochybnili.

Identifikace spermatogoniálních kmenových buněk pro účely transplantačních experimentů vyžaduje nedestruktivní techniky pro přesnou identifikaci, izolaci a purifikaci buněk. Transplantované buňky musí zůstat plně funkční, aby byly schopné osídlit semenotvorný epitel příjemce a začaly proliferovat a diferencovat až ve zralé spermie.

Na kmenových buňkách se běžně nachází několik povrchových proteinů - například integrin $\alpha 6$, integrin $\beta 1$, SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen 1), EMA-1 (epithelial membrane antigen 1) atd. (Buageaw et al., 2005; Jung et al., 2005; 2007). Při použití protilátek proti těmto povrchovým proteinům v kombinaci s průtokovou cytometrií nebo magnetickou separací je možné izolovat populace kmenových buněk a obohatit směs čerstvě izolovaných testikulárních buněk o kmenové buňky. V uplynulých letech se podařilo identifikovat několik kandidátních markerů kmenových spermatogoniálních buněk. Nejzásadnější z nich, zejména pro aplikaci u ptáků, shrnuje následující část práce.

Neurotrofni faktor gliových bunek (GDNF) je protein z rodiny transformujících rüstových faktorü, který byl původně identifikován jako rüstový faktor podporující přežití nervových bunek, a díky tomu dostal svůj název (Heukeroth et al., 1988; Meng et al., 2000; Tadokoro et al., 2002; Wang et al., 2002). Kromě nervové tkáně byl nalezen také v ledvinách, plicích, krvi a varlatech (Suter-Crazzolaro et Unsicker, 1994; Trupp et al., 1995; Suvanto et al., 1996). GDNF ve varlatech je produkován Sertoliho buňkami (Tadokoro et al., 2002; Yomogida et al., 2003; Hofmann et al., 2005). Narušení jeho produkce vede k poruchám spermatogeneze a neplodnosti (Buageaw et al., 2005). Podporuje proliferaci nediferencovaných spermatogoniálních bunek *in vitro* i *in vivo* (Meng et al., 2000; Creemers et al., 2002, Tadokoro et al., 2002; Yomogida et al., 2003), což činí z jeho receptoru GFR α -1 (GDNF family receptor alfa-1) kandidátní marker pro rozpoznání spermatogoniálních bunek (Meng et al., 2000). Dettin et al. (2003) první publikovali, že několik typü spermatogonií u myši exprimuje GFR α -1 receptor. O expresi GFR α -1 receptoru v savcích varlatech existují protichüdné údaje. Fouchécourt et al. (2006) popsali u potkanü přítomnost GFR α -1 receptoru jak u spermatogonií, tak u spermatocytü a kruhových spermatid. Oproti tomu He et al. (2010) popsal u myši přítomnost GFR α -1 zejména u kmenových spermatogoniálních bunek. Podle Meng et al., (2000), Kanatsu-Shinohara et al., (2003a), Kubota et al., (2004), Buageaw et al. (2005) a Hofmann et al., (2005) je u savcü receptor GFR α -1 exprimován na nediferencovaných spermatogoniích včetně kmenových spermatogoniálních bunek. Přítomnost tohoto receptoru na povrchu testikulárních bunek ptákü byla objasněna teprve nedávno (Mucksová et al., 2013 – viz příloha 3).

Dalšími kandidátními markery pro identifikaci kmenových spermatogoniálních bunek jsou některé transmembránové proteiny ze skupiny integrinü. Integriny řídí interakci mezi buňkami a extracelulární matrix (Jung et al., 2005). Podle Shinohara et al. (1999) vykazují spermatogoniální kmenové buňky u myši vysokou expresi α 6 a β 1 integrinu a selekcí bunek exprimujících tyto dva integriny lze obohatit suspenzi testikulárních bunek o kmenové buňky 5 až 10x.

CD 117 neboli c-Kit je receptor pro Stem Cell Factor (SCF). Tento tyrosin kinázový receptor je exprimován hematopoetickými kmenovými buňkami a s postupnou diferenciací těchto bunek jeho exprese klesá (Rönnstrand, 2004). Exprese c-Kit receptoru je charakteristická také pro primordiální zárodečné buňky (PGC) (Rossi et al., 2000), ze kterých vznikají kmenové spermatogoniální buňky. Přítomnost c-Kit receptoru v kmenových spermatogoniálních buňkách je obsahem debat již mnoho let. Schrans-Stassen et al. (1999) se shodují s Ohta et al. (2000) i Shinohara et al. (2000) v tom, že c-Kit se vyskytuje u pozdějších

typů spermatogonií, jako jsou u myši A_{al} , A_1-A_4 a B spermatogonie. Kmenové A_s spermatogonie a A_{pr} spermatogonie jsou c-Kit negativní. Trefil et al. (2010) použili pro transplantaci testikulárních buněk do varlat kohouta obohacenou populaci c-Kit pozitivních buněk. Ačkoli u ptáků nebyla prokázána přítomnost c-Kit receptoru na kmenových buňkách, tyto dárcovské zárodečné buňky po přenosu do sterilního příjemce osídlily semenotvorný epitel, obnovily spermatogenezi a od dvou ze sedmi kohoutů bylo získáno potomstvo.

SSEA (stage-specific embryonic antigens) jsou sacharidové antigeny, které se rutinně používají pro charakteristiku pluripotentních buněk u savců (Jung et al., 2005). Krutí PGC jsou pozitivní na SSEA-1 (D'Costa et Petite, 1999). EMA-1 (epithelial membrane antigen) je povrchový glykoprotein, který se specificky váže k myším embryonálním kmenovým buňkám a k PGC u ptáků (Urven et al., 1988; Urven et al., 1989; Jung et al., 2005). Pomocí SSEA-1 a EMA-1 lze izolovat vysoce čistou populaci PGC (McCarrey et al., 1987; Abe et al., 1996), ale stejně jako u c-Kit receptoru exprese těchto markerů s diferenciací kmenových buněk vymizí a nemohou být tak použity pro jejich identifikaci (Cooke et al., 1993).

V uplynulých letech bylo identifikováno několik dalších kandidátních markerů pro identifikaci spermatogoniálních buněk (Lasalle et al., 2004; Mucksová et al., 2009). Ovšem unikátní marker, který by byl typický pouze pro kmenové spermatogoniální buňky, nebyl prozatím objeven.

2.3 Transplantace testikulárních buněk

Metoda přenosu samčích zárodečných buněk z varlat plodného jedince do varlat neplodného příjemce byla poprvé provedena u hlodavců. Brinster a Zimmermann (1994) izolovali buňky z varlat myši a po několika hodinách je přenesli do sterilních varlat příjemců. Tyto dárcovské buňky osídlily semenotvorný epitel příjemce a obnovily spermatogenezi. Výsledkem tohoto pokusu byla produkce morfologicky normálních zralých spermií s genotypem dárce u třetiny experimentálních zvířat.

Účinnost experimentů zaměřených na transplantaci testikulárních buněk se zvyšuje, pokud má příjemce buď žádné nebo co nejmenší počet vlastních spermatogonií. Před samotnou transplantací je možné zastavit proces spermatogeneze, tedy sterilizovat příjemce.

Možnosti sterilizace příjemců pro účely transplantačních pokusů

Vlastní spermatogeneze příjemce může být blokována během embryonálního vývoje i v dospělosti pomocí busulfanu, který má sterilizační účinky na samce savců i ptáků (Vick et al., 1993; Brinster et Zimmermann, 1994; Song et al., 2005). Ačkoli někteří autoři škodlivost busulfanu potvrzují (Smýkalová et al., 1998), jiní jej naopak vyvracejí (Song et al., 2005). Protože je busulfan v určitých dávkách toxický pro hematopoetický systém, doporučují někteří autoři ještě před podáním busulfanu transplantaci kostní dřeně (Dobrinski et al., 2000; Kanatsu-Shinohara et al., 2003b).

Další metodou pro sterilizaci příjemců je vystavení varlat γ -záření, a to buď jednorázově nebo opakovaně v mírných dávkách (Pinon-Lataillade et al., 1991; Judas et al., 1996; Creemers et al., 2002; Izadyar et al., 2003). Creemers et al. (2002) vyvinuli metodu pro zničení spermatogeneze ve varlatech myši pomocí lokálního opakovaného γ -záření. Příjemci byli vystaveni nejprve dávce 1,5 Gy (gray) a za 24 hodin dávce 12 Gy. Výsledkem bylo více než 95 % prázdných tubulů jeden měsíc po ozáření bez zjevného efektu na Sertoliho buňky. Trefil et al. (2003) testovali vliv různých dávek záření na dospělé kohouty. Rozdělili je na 4 skupiny, přičemž první skupina byla ozářena jedinou dávkou o síle 18 Gy, druhá skupina dávkou o síle 22 Gy, třetí skupina dávkou o síle 26 Gy a nakonec čtvrtá skupina celkovou dávkou 40 Gy, která byla ovšem rozdělena do 5 částí po 8 Gy v průběhu 15 dnů. U prvních třech skupin, které byly vystaveny jedinému záření síle 18 – 26 Gy sice došlo k dramatickému poklesu motility a koncentrace spermií brzy po ozáření, ale nikdy nedošlo k úplnému zastavení spermatogeneze. U prvních dvou skupin se dokonce produkce spermií po půl roce vrátila na úroveň podobnou jako před zahájením ozařování. U čtvrté skupiny (5 x 8 Gy) došlo k úplnému zastavení spermatogeneze 45. den po prvním ozáření. Trefil et al. (2003; 2006) na základě svých experimentů konstatují, že dávka 5 x 8 Gy dospělé kohouty bezpečně sterilizuje, ale populace Leydigových a Sertoliho buněk ponechává morfologicky neporušené. Tato dávka také nemá vliv na zdraví a chování kohoutů.

Ideální pro účely transplantace jsou kmeny myši, u kterých díky genetickému defektu spermatogeneze vůbec neprobíhá, jako například myši s mutovanou alelou W (homozygotně dominantní W/W) (Brinster et Zimmermann, 1994; Ogawa et al., 2000).

Při transplantačních experimentech není vždy nezbytné sterilizovat příjemce. Existují transgenní hlodavci, kteří mají bakteriální gen pro enzym β -galaktosidázu (lacZ gen). Tento enzym štěpí fyziologicky disacharid laktózu na galaktózu a glukózu a také umělý substrát X-gal, který se štěpením zbarví modře. Po přidání X-gal se dárcovské buňky s lacZ genem barví

modře, zatímco buňky příjemce zůstávají neobarvené. Tento způsob umožňuje jasnou identifikaci dárcovských buněk v těle příjemce (Clouthier et al., 1996; Zambrowicz et al., 1997; Dobrinski et al., 1999). Nabídka transgenních zvířat s lacZ markerovým genem je ale omezena jen na myši a potkany (Dobrinski et al., 1999). Pokud je ale cílem transplantacních experimentů nejen zkoumání osudu dárcovských buněk ve varleti příjemce, ale i získání plně funkčních spermií a potomků, pak je výhodnější, aby semenotvorný epitel příjemce neobsahoval žádné vlastní spermatogonie a nedocházelo tak ke kompetici s hostitelskými buňkami.

Druhým důležitým faktorem pro úspěšnou transplantaci je skutečný počet kmenových spermatogoniálních buněk v suspenzi dárcovských buněk. Jak již bylo zmíněno výše, pouze kmenové spermatogoniální buňky jsou totiž schopné obnovit spermatogenezi. Identifikaci kmenových spermatogoniálních buněk se pozorněji věnovala kapitola 2.2. Ačkoli byly zaznamenány větší či menší úspěchy i při transplantacích testikulárních buněk s neznámým počtem kmenových buněk (Trefil et al., 2006; Song et Silversides, 2007a), přesná identifikace a izolace kmenových zárodečných buněk může významně ovlivnit účinnost těchto experimentů.

Do úspěchu transplantacních experimentů promlouvá kromě dobře připraveného příjemce a dobře vybrané populace buněk i postup při transplantaci a aplikaci dárcovských buněk. K suspenzi buněk lze přidat barvivo Trypan Blue, což umožní sledovat plnění semenotvorných kanálků při aplikaci do varlat (Brinster et Zimmermann, 1994). U velkých zvířat se při transplantaci s úspěchem využívá ultrasonografie a s pomocí mikromanipulátoru je možná přesná aplikace buněk přímo do jednotlivých semenotvorných kanálků, do odvodných žláz nebo do *rete testis* (Schlatt et al., 1999; Honaramooz et al., 2002; 2003a). U ptáků je situace oproti savcům komplikována uložením varlat v dutině břišní, což stěžuje i proces sterilizace – přesné zacílení na varlata během záření (Trefil et al., 2003). Velmi záleží na správné fixaci a stabilizaci zvířat při procesu ozařování a také na přesné transplantaci buněk.

Od té doby, co Dr. Ralph Brinster s kolegy popsali metodu transplantace testikulárních buněk z plodného samce do varlat neplodného samce u myši (Brinster et Zimmermann, 1994), byla tato metoda optimalizována i pro jiné druhy domestikovaných i volně žijících obratlovců. Nejčastěji se používá u savců zejména u hlodavců (Brinster et Avarbock, 1994; Clouthier et al., 1996; Kanatsu-Shinohara et al., 2003b), velkých hospodářských zvířat

(Honaramooz et al., 2002; 2003a; Izadyar et al., 2003; Herrid et al., 2009), ale i primátů včetně člověka (Schlatt et al., 1999; Nagano et al., 2001; Schlatt et al., 2002). V poslední době se transplantace testikulárních buněk používá experimentálně i u ryb (Nagler et al., 2001; Lacerda et al., 2006; 2008; Majhi et al., 2009) a drůbeže (Trefil et al., 2006; 2010; Pereira et al., 2013). Výše uvedené studie dosáhly na poli transplantace zárodečných buněk větších či menších úspěchů. Obvykle dojde k osídlení příjemcova semenotvorného epitelu a zahájení spermatogeneze. Spermatogonie proliferují, v některých případech se i diferencují ve spermatocyty i spermatidy (Schlatt et al., 2002, Izadyar et al., 2003). Plně funkčních spermií se schopností oplodnit vajíčko a následného získání potomků s genotypem dárce se podařilo docílit u myši (Brinster et Avarbock, 1994; Goossens et al., 2003), potkanů (Zhang et al., 2003), ovcí (Herrid et al., 2009), koz (Honaramooz et al., 2003a), ryb (Majhi et al., 2009) a kohoutů (Trefil et al., 2006; Song et Silversides, 2007a; Trefil et al., 2010).

Zajímavým faktem je, že u některých druhů zvířat je pro úspěšnou transplantaci důležité, aby dárce a příjemce byli blízce příbuzní nebo aby příjemci byla potlačena imunitní odpověď (Kanatsu-Shinohara et al., 2003b; Zhang et al., 2003, Izadyar et al., 2003). Například u prasat, koz nebo skotu je transplantace většinou úspěšná i bez podmínky příbuznosti dárce a příjemce (Honaramooz et al., 2002b; 2003a,b; Hill et Dobrinski, 2006). Hill et Dobrinski (2006) přenesli zárodečné buňky mezi dvěma plemeny skotu a ještě 8 týdnů po přenosu obsahovaly semenotvorné kanálky příjemce dárcovské buňky. Trefil et al. (2006) použili pro transplantaci u kohoutů imunokompetentní linie, Song et Silversides (2007a,b) aplikovali po transplantaci příjemcům imunosupresiva, aby zabránili odhojení cizí tkáně. Obě tyto metody se osvědčily a v obou případech došlo nejen k obnově spermatogeneze, ale i k získání potomků s genotypem dárce. Úspěšná transplantace samčích zárodečných buněk při použití odlišných plemen nebo bez aplikace imunosupresiv nebyla zatím u ptáků publikována.

Úspěšnost transplantací testikulárních buněk u ptáků byla prokázána obnovou spermatogeneze a produkcí potomků s genotypem dárce u 50 % jedinců (Trefil et al., 2006). Přenos samčích zárodečných buněk představuje jedinečný a velmi cenný nástroj pro studium spermatogeneze zejména pro proliferaci a diferenciaci zárodečných buněk, ale také pro zachování genetických zdrojů jako alternativní nástroj k uchování spermií. K tomuto účelu je ale nutné dokázat skladovat tyto buňky pokud možno neomezeně dlouhou dobu. Dlouhodobé uchování buněk umožňuje metoda kryokonzervace.

2.4 Kryokonzervace testikulárních buněk

První pokusy s mrazením testikulární tkáně byly provedeny již před 60 lety (Parkes et Smith, 1954) u potkanů krátce poté, co byly objeveny kryokonzervační účinky glycerolu (Polge et al., 1949). Autoři tehdy odebrali testikulární tkáň a bez další izolace buněk ji zamrazili v glycerolu. Po rozmrazení transplantovali kus tkáně subkutánně na bok kastrovaných potkanů. Ačkoli nedošlo k plné obnově spermatogeneze a produkci spermií, některé semenotvorné kanálky obsahovaly aktivně se dělící spermatocyty. Od té doby se podařilo zamrazit samčí zárodečné buňky u několika druhů domestikovaných i volně žijících savců. Tyto buňky byly mrazeny běžnými metodami, které se používají při mrazení somatických buněk a účinnost těchto metod je až překvapující ve srovnání s obtížemi při mrazení spermií. Kmenové buňky se však svou strukturou a biologií podobají mnoha typickým somatickým buňkám, zatímco spermie mají unikátní morfologii, značně kondenzovanou jadernou DNA a málo cytoplasmy, což tyto buňky činí velmi citlivými k fyzikálním a chemickým změnám během mrazení a rozmrazování (Brinster et Nagano, 1998). Při kryokonzervaci testikulárních buněk se většinou využívá stejných postupů jako při kultivaci a mrazení somatických buněk. Mrazící medium obsahuje nejčastěji 10% Dimethylsulfoxide (DMSO) jako kryoprotektivum, které je přidáváno k buňkám postupně. Buňky jsou vystaveny pomalému postupnému zchlazování až do teploty -80°C a pak jsou ponořeny do tekutého dusíku (Avarbock et al., 1996; Ogawa et al., 1999; Dobrinski et al., 1999; 2000; Izadyar et al., 2002; 2003). Ojedinelé je použití glycerolu namísto DMSO (Schlatt et al., 2002). Izadyar et al. (2002) porovnávali dvě zmiňovaná kryoprotektiva a jednoznačně lepších výsledků dosáhli s DMSO. Viabilita testikulárních buněk při použití konvenčního způsobu mrazení se po rozmrazení pohybuje mezi 43-60 % u hlodavců (Avarbock et al., 1996; Ogawa et al., 1999), a mezi 46-69 % u velkých hospodářských zvířat (Dobrinski et al., 2000; Izadyar et al., 2000; 2003).

Ačkoli viabilita buněk po rozmrazení je u mnoha druhů poměrně vysoká, jejich funkčnost je prověřena až po transplantaci do varlat příjemce. V některých případech totiž autoři pozorovali obnovu spermatogeneze, ale nedošlo k tvorbě zralých plně funkčních spermií, které by byly schopné oplodnit vajíčko ať už *in vitro* nebo *in vivo*. Získat potomky po přenosu zamrazených testikulárních buněk u savců se zatím podařilo pouze u hlodavců (Shinohara et al., 2002; Kanatsu-Shinohara et al., 2003c; Lee et al., 2013).

Pokusy s kryokonzervací a následnou transplantací testikulárních buněk u ptáků jsou velmi sporadické (Song et Silversides, 2007b) a prozatím nebyl publikován experiment, který

by popisoval úspěšnou obnovu spermatogeneze a získání potomstva po přenosu zamrazených testikulárních buněk. Přitom uchování samčích zárodečných buněk neomezeně dlouhou dobu představuje alternativu k uchování spermií a mohlo by stejně tak dobře sloužit k uchování genetických zdrojů a záchraně či obnově druhů. Kromě uchování reprodukční kapacity geneticky cenných jedinců slibuje transplantace zárodečných buněk také produkci transgenních zvířat prostřednictvím přenosu geneticky modifikovaných samčích zárodečných linií buněk.

3. VĚDECKÉ HYPOTÉZY A CÍLE PRÁCE

Hlavní náplní disertační práce bylo využití metody kryokonzervace k dlouhodobému uchování testikulárních buněk kura domácího a identifikace a izolace vybraných samčích zárodečných buněk.

Hypotézy:

1. Pomocí zamrazených testikulárních buněk lze po transplantaci do varlat příjemců obnovit spermatogenezi a produkovat potomstvo s genotypem dárce.
2. Pomocí vybrané populace samčích zárodečných buněk lze po transplantaci do varlat příjemců obnovit spermatogenezi a získat potomstvo s genotypem dárce.

Konkrétní cíle práce lze shrnout do následujících bodů:

- Příprava příjemců na transplantaci dárcovských buněk pomocí ozařování
- Izolace testikulárních buněk
- Vývoj zamrazovacích protokolů pro dlouhodobé uchování testikulárních buněk
- Transplantace zamrazených testikulárních buněk do varlat příjemců
- Identifikace vybraných samčích zárodečných buněk
- Izolace vybrané populace samčích zárodečných buněk
- Transplantace vybraných samčích zárodečných buněk do varlat příjemců

4. MATERIÁL A METODY

4.1 Kryokonzervace a transplantace testikulárních buněk

4.1.1 Pokusná zvířata

Jako dárci testikulárních buněk byli použiti dospělí inbrední černí kohouti linie CC21 - 5 jedinců (black minor, BM) a kromě toho jeden dospělý outbrední kohout černá hedvábníčka (black silkie, BS). Za příjemce bylo vybráno 24 dospělých outbredních kohoutů bílá leghornka (white leghorn, WL). Dále byli dva kohouti stejného původu jako příjemci použiti jako pozitivní kontrola (ozáření kohouti, jimž byly transplantovány čerstvé nemrazené testikulární buňky) a čtyři kohouti jako negativní kontrola (ozáření kohouti bez transplantace). Během těchto experimentů bylo dále použito 64 slepic leghornek žíhaných (linie SH).

Slepice byly chovány individuálně v klecovém systému, kohouti dárci skupinově a příjemci jednotlivě na hluboké podestýlce za standardních chovných podmínek s fotoperiodou 16:8, krmení a napájení bylo poskytováno *ad libitum*. Všechna zvířata vyjma jednoho dárce BS pocházela z Ústavu molekulární genetiky, AV ČR, Koleč. BS dárce pocházel z vlastního chovu Výzkumného ústavu biofarmacie a veterinárních léčiv, BIOPHARM. Veškeré experimenty byly prováděny v souladu s českými zákony na ochranu zvířat proti týrání.

Příprava příjemců

Příjemcům byla před transplantací zastavena jejich vlastní spermatogeneze. Kohouti byli po dosažení pohlavní dospělosti vystaveni opakovaně záření o síle 8 Gy [Theratron T1000 radiation treatment unit using ^{60}Co (Theratronics International Ltd., Kanata, Ontario, Canada)]. Kohouti byli ozáření 5 x během 14 dnů. Dva týdny po posledním ozařování byli ponecháni v klidu a poté jsme jim začali odebírat ejakulát 1 x týdně. Pokud byli kohouti 4 x po sobě označeni jako azospermičtí, teprve tehdy bylo přikročeno k transplantacím. Pozitivní i negativní kontroly byly vystaveny stejnému schématu ozáření.

4.1.2 Izolace a kryokonzervace testikulárních buněk

Po eutanázii byla dárce odebrána varlata a v případě znečištění krví omyta ve fyziologickém roztoku. Pomocí nůžek a pinzet byla nejprve odstraněna *tunica vaginalis* a *tunica albuginea*, poté byla varlata příčně překrojena a testikulární tkáň nastříhána na kusy o velikosti zhruba 3 x 3mm. Testikulární tkáň byla natrávena pomocí dvoustupňového trávení

v roztoku kolagenázy typu I při 35°C 20 minut (Coll I 100U/ml, 1,2mM MgSO₄, 1,3mM CaCl₂, 6,6mM pyruvát sodný, glutamin, PBS – phosphate buffered saline; Sigma-Aldrich, Německo) za účelem odstranit intersticiální buňky. Poté byla testikulární tkáň 3 x promyta v PBS a naředěna mrazicím roztokem.

Jako kryoprotektivum byl použit jednak 10% Dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich, Německo), a dále Biofreeze (Biochrom, Německo) v poměru 1 díl buněk a 9 dílů Biofreeze přesně podle návodu výrobce. Naředěná suspenze buněk byla rozplněna do kryozkumavek (Nalgene, Sigma-Aldrich, Německo), kryozkumavky umístěny do mrazicího boxu s propylalkoholem (Mr. Frosty, Nalgene, Sigma-Aldrich, Německo), který zajišťuje pokles teplot o 1°C/min. Po 4 hodinách byly zkumavky přemístěny do tekutého dusíku. Zde byly buňky skladovány až do transplantace, tzn. 2 dny až 7 měsíců.

4.1.3 Viabilita testikulárních buněk

Viabilita buněk byla hodnocena ihned po izolaci a dále po rozmrazení pomocí průtokové cytometrie. Propidium jodid, který proniká přes porušenou membránu buněk, byl použit na vyloučení mrtvých buněk. Analýzy průtokové cytometrie probíhaly na čtyřlaserovém průtokovém cytometru LSRII (Becton Dickinson, USA) v Ústavu molekulární genetiky Akademie Věd ČR.

4.1.4 Transplantace testikulárních buněk

Dárcovské testikulární buňky byly rozmrazeny ve vodní lázni při 37°C, 2 x promyty v DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) a naředěny do koncentrace minimálně 2 x 10⁶ buněk/ml. Transplantace byly provedeny za plné narkózy. Příjemcům byl intramuskulárně podán Narkamon a Rometar (Bioveta, ČR) v dávce 0,4 respektive 0,2 ml/kg. Suspenze testikulárních buněk byla injikována přímo do varlete, a to 250 µl do každého varlete (tedy 500 000 buněk na jedno varle). Dvěma kohoutům ponechaným jako pozitivní kontrola byly injikovány buňky od jednoho ze šesti dárců (BS), ale ihned po odběru a izolaci.

4.1.5 Ověření účinnosti transplantace zamrazených testikulárních buněk

Pro ověření účinnosti transplantace testikulárních nebo vybraných samčích zárodečných buněk bylo použito barevného modelu, který je založen na určení paternity

potomků dle zbarvení peří (obrázek 1 v příloze 1). Tento barevný model byl zvolen záměrně, aby v případě získání potomků bylo okamžitě po vylíhnutí možné identifikovat původ kuřat a vyhodnotit tak úspěch transplantace dárcovských buněk. Černý nebo žíhaný genotyp v F1 generaci vypovídá o úspěšném přenosu a obnovení spermatogeneze z buněk dárce, a to jak v případě černého dárce inbrední linie CC21, tak dárce černé silkie. Přítomnost bílých kuřat v potomstvu F1 naznačuje, že sterilizace ozářením nebyla kompletní a potomci tedy pocházejí z buněk kohouta příjemce, jemuž se obnovila jeho vlastní spermatogeneze.

Asi čtyři týdny po transplantaci jsme začali příjemcům odebírat ejakulát pomocí dorsoabdominální masáže (Burrows et Quinn, 1937). Jakmile koncentrace spermií v ejakulátu vzrostla na minimálně $1 \times 10^7/\text{ml}$, bylo přikročeno k intravaginální inseminaci. Ejakulát od jednoho kohouta byl použit na inseminaci dvou slescic. Inseminace byla prováděna 2 x týdně neředěným ejakulátem bezprostředně po odběru. Vejce byla sbírána 6 měsíců po transplantaci a inkubována za standardních podmínek v líhni.

Pokud koncentrace spermií nedosáhla minimálně $1 \times 10^7/\text{ml}$, byla provedena chirurgická intramagnální inseminace. Slescice byly během operace pod celkovou narkózou (Narkamon a Rometar v dávce 0,4 respektive 0,2 ml /kg; Bioveta, ČR) a čerstvý ejakulát byl injikován do horní části vejcovodu (*magnum*) nejdéle 10 minut po odběru. Detailněji je postup při intramagnální inseminaci popsán v příloze 1. Vejce od těchto slescic byly sbírány tři týdny a inkubovány. Oplozenost všech vajec byla zjišťována prosvícením 7. den inkubace. Vejce, která se nevyvíjela, byla rozbita, aby se vyloučila raná embryonální mortalita. Oplozenost byla počítána jako podíl oplozených vajec ku všem nasazeným vejcím $\times 100$. Líhnivost byla vypočítána jako podíl vylíhnutých kuřat ku počtu oplozených vajec $\times 100$.

4.2 Transplantace vybraných samčích zárodečných buněk

4.2.1 Pokusná zvířata

Za dárce buněk byl vybrán dospělý kohout (genotyp ii,Ee,Bb, leghornka žíhaná). Příjemci buněk byli dva dospělí kohouti bílá leghornka (WL, genotyp II). Dva kohouti stejného genetického původu jako příjemci byli ponecháni jako pozitivní kontrola. Tito nebyli vystaveni ozařování ani transplantacím. Další dva kohouti rovněž stejného původu jako příjemci byli ponecháni jako negativní kontrola - byli ozářeni stejně jako příjemci, ale nebyly jim transplantovány žádné buňky. Pro umělou inseminaci byly použity slescice žíhané leghornky (linie SH). Zvířata byla chována za stejných podmínek jako je popsáno výše

v kapitole 4.1.1. Všechna zvířata pocházela z Kolče, detašovaného pracoviště Ústavu molekulární genetiky, Akademie Věd, ČR. Veškeré experimenty byly prováděny v souladu s českými zákony na ochranu zvířat proti týrání.

Příjemci buněk byli před transplantacemi vystaveni opakovanému záření, aby došlo k zastavení jejich vlastní spermatogeneze. Ozařování probíhalo podle stejného schématu jako v kapitole 4.1.1.

4.2.2 Příprava rekombinantního kuřecího GFR α -1 proteinu

RNA z varlat byla izolována pomocí Ultraspec II RNA reagent (BIOTECHX Laboratoriem, USA) přesně podle přiloženého návodu. Čistota a kvantifikace RNA byla ověřena na spektrofotometru Nanodrop (Herma Scientific, USA). RNA byla dále přepsána do cDNA s využitím High Fidelity cDNA Synthesis Kit (ROCHE) dle návodu.

Z testikulární cDNA byl pomocí PCR amplifikován fragment genu GFR α -1 s vhodnými restrikčními místy. PCR primery byly navrženy pomocí volně dostupného programu Primer 3 (Genefisher, Německo). Složení reakční směsi a profil PCR je popsán v Mucksová et al. (2013) – příloha 3. Amplifikovaný fragment byl modifikován pomocí restriktáz BamHI/SalI a zaklonován do vektoru pGEX (GE Healthcare). Správný čtecí rámec byl potvrzen sekvenováním. pGEX vektor byl posléze transformován do bakterií Rosetta *Escherichia coli* (Novagen, USA). Exprese rekombinantního proteinu byla indukována pomocí IPTG (Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside). Po několika hodinách byly bakteriální buňky lyzovány a získaný protein purifikován pomocí Gluthathione Sepharose 4B.

4.2.3 Příprava polyklonálních protilátek

Získaný rekombinantní kuřecí GFR α -1 protein byl použit pro imunizaci myši. Myši byly imunizovány 4 x intraperitoneálně v 12 denních intervalech. Rekombinantní protein byl naředěn ve Freundově adjuvans. Koncentrace protilátek v séru byla ověřována pomocí ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Specifita séra byla ověřena průtokovou cytometrií a imunohistochemií na parafinových řezech. Detailnější informace k analýzám jsou obsaženy v Mucksová et al. (2013) – příloha 3.

4.2.4 Průtoková cytometrie

Kvůli detekci GFR α -1 povrchového markeru byly izolované testikulární buňky inkubovány na ledu 50 minut s myším polyklonálním sérem proti rekombinantnímu kuřecímu GFR α -1. Jako sekundární protilátka byl použit kozí anti-myší IgM a IgG konjugovaný fluorochromem FITZ. Takto značené GFR α -1 buňky byly následně použity pro průtokovou cytometrii. Analýzy průtokové cytometrie probíhaly na průtokovém cytometru FACS Vantage SE (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) v Ústavu molekulární genetiky Akademie Věd ČR.

Identifikace jednotlivých buněčných populací ve varlatech kohouta byla provedena na základě obsahu DNA pomocí barviva Hoechst 33342. Hoechst 33342 proniká přes plasmatickou a jadernou membránu živých buněk a váže se na DNA. Oproti tomu propidium jodid proniká do buněk s poškozenými membránami. Živými buňkami s neporušenou membránou je vylučován. Toto barvivo bylo použito k diskriminaci živých a mrtvých buněk.

4.2.5 Izolace a selekce a transplantace GFR α -1 pozitivních buněk

Dárcovské testikulární buňky byly izolovány stejným způsobem jako je popsáno v kapitole 4.1.2. K čerstvě izolované suspenzi buněk byly přidány polyklonální myší anti-kuřecí GFR α protilátky. Po 30 minutách inkubace při 4°C byly přidány sekundární protilátky (kozí anti myší IgG). Kuřecí GFR α -1 pozitivní buňky byly izolovány imunomagnetickou separací (MACS) podle návodu výrobce. (DynaL, Norsko).

Selektované GFR α -1 buňky byly použity na transplantaci do neplodných kohoutů. Transplantace byly provedeny za plné narkózy. Příjemcům byl intramuskulárně podán Narkamon a Rometar v dávce 0,4 respektive 0,2ml/kg (Bioveta, ČR). Suspenze testikulárních buněk byla injikována přímo do varlete, a to 250 μ l do každého varlete. Koncentrace buněk v suspenzi se pohybovala v rozmezí 10⁵-10⁶ buněk v 1 ml. Buňky byly injikovány přímo do varlat na 5 náhodně vybraných míst.

4.2.6 Ověření účinnosti transplantace GFR α -1 pozitivních buněk

Dva týdny po transplantaci byly zahájeny první odběry ejakulátu. Ejakulát byl prověřován na mikroskopu Olympus IX50 na přítomnost spermií. V případě obnovy spermatogeneze bylo přikročeno k umělé inseminaci. Šest slepic bylo inseminováno 2 x týdně neředěným ejakulátem bezprostředně po odběru. Vejce byla inkubována za standardních

podmínek v líhni. Oplozenost všech vajec byla zjišťována prosvícením 7. den inkubace. Vejce, která se nevyvíjela, byla rozbita, aby se vyloučila raná embryonální mortalita.

Paternita potomků byla určena stejně jako při experimentu s kryokonzervací a transplantací testikulárních buněk pomocí barevného modelu, který je založen na barvě peří. Ejakulát dárce buněk – žíhané leghornky – s genotypem *ii*, *Ee*, *Bb* byl použit při umělé inseminaci se slepicemi – žíhanými leghornkami - s genotypem *ii*, *ee*, *B-*. Jak kohouti, tak slepice mají dominantní alelu *B*, která způsobuje žíhání peří a oba jsou recesivní homozygoti v lokusu *I*. Jejich potomci tedy mohou být černí nebo žíhaní, ale nikdy ne bílí. Naopak příjemce buněk je bílý díky dominantně homozygotní kombinaci alely *I* (*II*). Pokud by se po přenosu buněk a obnově spermatogeneze objevilo v potomstvu bílé kuře, znamená to, že příjemci se obnovila jeho vlastní spermatogeneze a že ozařování nebylo dostatečně účinné.

5. VÝSLEDKY

5.1 Kryokonzervace a transplantace testikulárních buněk

5.1.1 Viabilita buněk po izolaci a kryokonzervaci

Viabilita buněk byla hodnocena pomocí průtokové cytometrie po izolaci buněk a dále po rozmrazení. Izolaci přežilo vždy více jak 90 % buněk. Po zamrazení a rozmrazení se viabilita celkové suspenze buněk pohybovala v rozmezí 9 – 48,6 % živých buněk zamrazených v mediu obsahujícím Biofreeze a 10,6 – 40 % u buněk zamrazených v mediu s DMSO.

5.1.2 Obnova spermatogeneze u příjemců

Před začátkem experimentu, tedy ještě před zahájením ozařování, se koncentrace spermií v ejakulátu příjemců pohybovala okolo 1 - 4 x 10⁹/ml. Po zahájení ozařování koncentrace prudce klesala až na nulu a za 4-6 týdnů po posledním ozařování byli všichni kohouti hodnoceni jako azospermičtí. Čtyři týdny po transplantacích zamrazených testikulárních buněk byli příjemci ponecháni v klidu a po této době byl zahájen pravidelný odběr ejakulátu a to jednou týdně. První spermie v ejakulátu byly pozorovány nejdříve za 5 týdnů, nejčastěji v rozmezí 7 až 8 týdnů po transplantaci. Koncentrace spermií kolísala v rozmezí 10⁵ až 10⁸ na ml. Spermatogeneze se obnovila u 12 z 24 příjemců.

V případě pozitivních kontrol, kterým byly transplantovány čerstvé nezamrazené buňky se spermatogeneze obnovila u obou dvou kohoutů, a to za 6 týdnů u jednoho a za 8 týdnů u druhého kohouta. Koncentrace spermií u jednoho z nich se dostala po 9 měsících na úroveň jako před ozařováním, tedy na koncentraci $1-2 \times 10^9$ spermií/ml. V případě dvou kohoutů ponechaných jako negativní kontrola, kteří byli vystaveni ozařování, ale nebyly jim transplantovány žádné buňky, se spermatogeneze neobnovila ani u jednoho ze 4 jedinců.

5.1.3 Ověření účinnosti transplantace zamrazených testikulárních buněk

U kohoutů, u nichž došlo k obnovení spermatogeneze, bylo přikročeno k umělé inseminaci intravaginální i intramagnální. U šesti z dvanácti kohoutů došlo k vylíhnutí potomstva s genotypem dárce. Celkem bylo získáno 41 černých nebo žíhaných kuřat. U jednoho z příjemců došlo k částečnému obnovení jeho vlastní spermatogeneze a tedy produkci potomků jak s genotypem dárce tak jeho vlastních potomků. U ostatních pěti příjemců byli získáni potomci pouze s genotypem dárce.

U obou dvou kohoutů pozitivních kontrol došlo k produkci potomstva. Celkem bylo získáno 47 kuřat, všechny s genotypem dárce.

5.2 Transplantace vybraných samčích zárodečných buněk

5.2.1 Detekce GFR α -1 pozitivních buněk

Pomocí průtokové cytometrie jsme detekovali 2,8 % GFR α -1 pozitivních buněk ve směsi testikulárních buněk dospělého kohouta. Z toho bylo 1,6 % haploidních (spermatidy); 2,5 % diploidních (spermatogonie); 39,3 % tetraploidních (spermatocyty) a 76,8 % SP (side population) buněk.

5.2.2 Obnova spermatogeneze u příjemců

Před začátkem experimentu, tedy ještě před zahájením ozařování, se koncentrace spermií v ejakulátu příjemců pohybovala okolo $2 - 4 \times 10^9$ /ml. Po zahájení ozařování koncentrace prudce klesala až na nulu a za 5 týdnů po posledním ozařování byli kohouti příjemci i negativní kontroly hodnoceni jako azospermičtí. Osm týdnů po transplantaci jeden z příjemců začal produkovat spermie. Koncentrace spermií v ejakulátu se následujících sedm

týdnů zvyšovala až na úroveň, která byla dostatečná pro umělou inseminaci (minimálně 10^7 spermií/ml). U druhého příjemce se bohužel za sledované období nepodařilo prokázat přítomnost spermií. U obou kohoutů, kteří sloužili jako negativní kontrola, nebyla zaznamenána žádná produkce spermií.

5.2.3 Ověření účinnosti transplantace GFR α -1 pozitivních buněk

Plodnost příjemce s obnovenou spermatogenezí byla prokázána získáním potomstva s genotypem dárce. Od celkem 6 slepic bylo po umělé inseminaci získáno 190 vajec. Pouze 20 z nich (10,5 %) bylo oplozených a 15 z nich se vylíhlo (75 % líhivost). Z 15 vylíhnutých kuřat bylo 12 černých nebo žíhaných a 3 kuřata bílá.

6. DISKUZE

6.1 Kryokonzervace a transplantace testikulárních buněk

Cílem tohoto experimentu bylo jednak ověřit schopnost zamrazených testikulárních buněk obnovit po přenosu z plodného dárce do varlat neplodného příjemce spermatogenezi a dále porovnat účinnost přenosu při použití dvou různých kryoprotektiv – DMSO a Biofreeze.

U savců existuje mnoho studií, ve kterých se podařilo zamrazit testikulární nebo vybrané spermatogoniální buňky, které po přenosu do sterilního příjemce byly schopné obnovit alespoň částečně spermatogenezi (Avarbock et al., 1996; Ogawa et al., 1999; Dobrinski et al., 1999; Dobrinski et al., 2000; Nagano et al., 2001; Izadyar et al., 2002;2003). Experimentů s transplantací zamrazených testikulárních buněk a následným získáním potomků s genotypem dárce je ale jak u savců tak u ptáků velmi málo (Shinohara et al., 2002; Kanatsu-Shinohara et al., 2003c; Lee et al., 2013).

U ptáků bylo prozatím dosaženo úspěchu pouze při přenosu zamrazené testikulární tkáně (Song et Silversides, 2007b). Tito autoři odebrali testikulární tkáň jednodenním kuřatům, zamrazili ji pomocí DMSO a po rozmrazení transplantovali do břišní dutiny jednodenních vykastrovaných kuřat. Dospělí kohouti byli v 11 měsících utraceni a spermie získané z testikulární tkáně byly použity na intramagnální inseminaci. Výsledkem bylo získání potomstva s genotypem dárce. Tento experiment přinesl obrovský pokrok na poli kryokonzervace ptačí testikulární tkáně. Ovšem pro uchování genetických zdrojů není tato

metoda vhodná, protože je založena na jednodenních kuřatech. Pro zachovné programy mají smysl metody založené na využívání dospělých jedinců. Nevýhodou je i fakt, že spermie nutné k produkci potomstva, je možné získat až vyjmutím transplantátů a tedy zabití příjemce. Množství takto získaných spermií stačí jen na několik málo potomků. Oproti tomu náš transplantační model (Benešová et al., 2014 –viz příloha 1), ve kterém využíváme dospělých dárců i příjemců, není časově tolik náročný, protože odpadá doba, kdy je nutné čekat na pohlavní dospělost samců. Dále v případě, že dojde u příjemce k obnovení spermatogeneze, tento jedinec je schopen produkovat zralé spermie, které lze získat jednoduše odběrem v pravidelných intervalech a následnou umělou inseminací nebo dokonce přirozeným pářením lze získávat potomky po dlouhou dobu. V naší studii se podařilo získat potomky pomocí jak intramagnální, tak intravaginální inseminace, což je méně invazivní způsob. V neposlední řadě je nutné zmínit, že v případě, že by se jednalo o záchranu nějakého vzácného druhu nebo plemene s malou chovnou základnou, není nezbytně nutné odebírat dárcovské buňky až po smrti dárce, jako to děláme v našich experimentálních podmínkách. Dárci by bylo možné chirurgicky odebrat pouze jedno varle a druhé mu ponechat nebo provést biopsii a odebrat pouze malou část tkáně, takže by mohl dál produkovat spermie a mít další potomky. Z jednoho varlete kohouta lze bez problémů připravit buňky pro přenos do minimálně 10 příjemců.

V tomto experimentu jsme odebrali testikulární tkáň od šesti černých kohoutů, izolovali testikulární buňky a po zamrazení a rozmrazení jsme je aplikovali do varlat 24 bílých příjemců. Polovina příjemců zamrazených testikulárních buněk obnovila během osmi týdnů po transplantaci spermatogenezi. Čtvrtina příjemců zamrazených testikulárních buněk dosáhla dostatečné úrovně spermatogeneze pro oplození vajíčka a produkovala potomky s genotypem dárce. Pro mrazení a transplantaci buněk byla použita směs čerstvě izolovaných buněk bez další selekce. Trefil et al. (2006) dosáhli po přenosu takovéto směsi testikulárních buněk obnovy spermatogeneze také u poloviny příjemců, ovšem s nezamrazenými buňkami. Procento příjemců produkujících potomky s genotypem dárce bylo dokonce ještě nepatrně nižší, a to 20 % v případě transplantace buněk od dospělých dárců a 22 % v případě prepubertálních dárců. To, že účinnost přenosu zamrazených buněk je vyšší než přenos čerstvých buněk je pravděpodobně způsobena tím, že zatímco Trefil et al. (2006) injikovali do jednoho varlete cca 10^4 - 10^5 buněk, v tomto experimentu bylo injikováno minimálně 5×10^5 buněk.

Dalším důvodem pro rozdílné výsledky těchto dvou studií může být fakt, že zatímco Trefil et al. (2006) použili jako dárce buněk výhradně inbrední kohouty, my jsme použili

navíc jednoho kohouta plemene hedvábnička (BS). Buňky od tohoto dárcce byly ihned po izolaci injikovány do dvou neplodných kohoutů WL – pozitivních kontrol a dále zamrazeny a po rozmrazení injikovány do dalších čtyř neplodných kohoutů WL. Spermatogeneze se obnovila u obou kohoutů s transplantovanými čerstvými buňkami a u dvou ze čtyř příjemců zamrazených buněk od tohoto dárcce. Od všech čtyřech kohoutů s buňkami od dárcce BS, kteří obnovili spermatogenezi, byli získáni potomci již za pět měsíců od operace, tedy mnohem dříve než u příjemců buněk od inbredních dárců. Viabilita buněk BS dosáhla po rozmrazení také mnohem lepších výsledků. Při použití kryoprotektiva DMSO byla viabilita 40 % a při použití Biofreeze dokonce 48,6 %. Tyto výsledky naznačují, že BS je pro kryokonzervační a transplantační pokusy možná nadějnější než doposud používané imunokompetentní linie (Trefil et al., 2006; 2010; Mucksova et al., 2013). Toto plemeno má několik specifických vlastností jako je černá kůže, maso a kosti, namodralé ušnice, opeřené běháky a pět prstů. Přesto, že je natolik rozdílné a geneticky vzdálené od běžně chovaných plemen, nedochází po transplantacích k rejekci jeho buněk a zdá se být tudíž vhodným modelovým zvířetem pro experimenty s uchováním genetických zdrojů a variability.

Na zamrazení buněk byla použita dvě různá mrazicí media – jedno s běžně používaným kryoprotektivem DMSO a dále komerční mrazicí medium určené původně pro somatické buňky. Dvanáct kohoutů dostalo buňky zamrazené pomocí DMSO a dvanáct kohoutů buňky zamrazené pomocí Biofreeze. Celkem obnovilo spermatogenezi dvanáct příjemců – osmi z nich byly transplantované buňky zamrazené v DMSO a čtyřem z nich buňky zamrazené v Biofreeze. Potomstvo bylo ale získáno od tří kohoutů s transplantovanými buňkami v DMSO a od stejného počtu kohoutů s transplantovanými buňkami v Biofreeze.

Viabilita buněk po rozmrazení se u obou kryoprotektivů pohybovala v rozmezí 9 – 48,6 %. Průměrná viabilita u buněk zamrazených pomocí DMSO byla 24,9 % a 27,8 % pomocí Biofreeze. Statisticky nebyl nalezen žádný rozdíl mezi těmito dvěma kryoprotektivy. Jak je patrné z tabulky 3 (Příloha 1), minimální viabilita po rozmrazení byla 9,4 % u dárcce číslo 3 za použití mrazicího media Biofreeze a 10,6 % u dárcce číslo 2 za použití DMSO. Ani jeden z příjemců těchto buněk neobnovil spermatogenezi, což nasvědčuje tomu, že mrazení přežilo pouze velmi málo kmenových buněk, které nestačily na osídlení semenotvorného epitelu. Například Ogawa et al. (1999) uvádí při použití DMSO při mrazení křeččích testikulárních buněk viabilitu po rozmrazení 43 %, Dobrinski et al. (1999) dokonce 63 až 82 % viabilitu po rozmrazení u králíčích a psích buněk, Izadyar et al. (2002) 70 % u buněk býků. V těchto experimentech se ale vždy jednalo o savčí buňky, navíc výsledky byly hodnoceny jinými metodami a nelze je tedy porovnávat s našimi výsledky. I přes poměrně nízkou viabilitu

buněk po rozmrazení jsme dosáhli nejen obnovy spermatogeneze ve varlatech příjemců, ale i vylíhnutí potomků s genotypem dárce u 25 % příjemců.

Tímto experimentem jsme dokázali, že lze zamrazit kohoutí testikulární buňky a po rozmrazení a následné transplantaci buněk lze získat potomky s genotypem dárce s poměrně vysokou účinností. Tato metoda může sloužit vedle kryokonzervace spermií k uchování genetických zdrojů v záchovných programech. Kromě toho je tato metoda i cenným nástrojem pro transgenezi.

6.2 Transplantace vybraných samčích zárodečných buněk

Přítomnost GFR α -1 receptoru byla již dříve prokázána v semenotvorném epitelu myši, potkana a člověka (Davidoff et al., 2001; Dettin et al., 2003; Fouchécourt et al., 2006; He et al., 2010). Na základě pozorování Hofmann et al. (2005), kteří prokázali přítomnost tohoto receptoru na povrchu specifické populace spermatogoniálních buněk u myši, byl GFR α -1 vybrán jako kandidátní marker pro identifikaci kuřecích spermatogoniálních buněk.

V naší laboratoři jsme zjišťovali přítomnost a expresi GFR α -1 receptoru na kuřecích testikulárních buňkách. Pomocí průtokové cytometrie jsme detekovali 2,8 % GFR α -1 pozitivních buněk ve směsi testikulárních buněk dospělého kohouta. Z toho bylo 1,6 % haploidních (spermatidy); 2,5 % diploidních (spermatogonie); 39,3 % tetraploidních (spermatocyty) a 76,8 % SP buněk. SP je specifická populace testikulárních buněk, která je analýzami průtokové cytometrie detekována na pomezí haploidní a diploidní populace buněk. SP buňky mají několik morfologických vlastností stejných jako spermatogoniální kmenové buňky u kuřat, jako je velikost a typ jádra, zrnitost cytoplasmy a lokalizace uvnitř semenotvorných kanálků. Kromě toho mají SP buňky schopnost se zbavovat přidaných fluorescenčních barviv ve větší míře, než ostatní populace buněk (Challen et Little, 2006). Z analýzy průtokové cytometrie vyplynulo, že GFR α -1 pozitivní buňky se vyskytují v několika populacích testikulárních buněk. Největší procento bylo zastoupeno právě u SP populace buněk (76,8 %). Lze se tedy domnívat, že GFR α -1 receptor je vysoce specifický pro kmenové spermatogonie, ale nikoli výhradně pro tento typ buněk. Bohužel prozatím neexistují žádná spolehlivá morfologická kritéria nebo jednoznačné povrchové markery k určení spermatogoniálních kmenových spermatogonií a k jejich odlišení od ostatních

spermatogoniálních kmenových buněk. Přesný počet transplantovaných kmenových spermatogonií tedy nelze odhadnout.

Přesto je jasné, že určitý počet spermatogoniálních kmenových buněk se podařilo úspěšně transplantovat, protože od příjemců bylo získáno potomstvo s genotypem dárce. Celkem se vylíhlo 15 kuřat, z nichž 12 bylo černých nebo žíhaných a 3 kuřata byla bílá. Z dosažených výsledků je patrné, že transplantované GFR α -1 buňky černého kohouta dárce byly schopné osídlit semenotvorný epitel příjemce a obnovit spermatogenezi. Sterilizace příjemce ale nebyla kompletní, protože kromě černých nebo žíhaných kuřat se vylíhla i tři bílá kuřata, která jednoznačně nepocházejí od dárce. Ve varleti příjemce tedy došlo k produkci spermií jak od dárce, tak od příjemce. Příjemcovy buňky ale byly v menšině, protože od příjemce pocházelo 20 % kuřat, kdežto od dárce 80 % kuřat. Tato čísla jasně ukazují na lepší výsledky při použití GFR α -1 pozitivních selektovaných testikulárních buněk, než při použití c-Kit pozitivních buněk v dřívějším experimentu (Trefil et al., 2010). Autoři v experimentu s c-Kit obohacenou suspenzí testikulárních buněk dosáhli obnovy spermatogeneze u dvou ze sedmi příjemců a pouze 24 % potomků pocházelo z buněk dárce. U těchto dvou experimentů však byly použity buňky od dárců různého stáří a počet příjemců byl omezený. Přesto se lze domnívat, že transplantace GFR α -1 pozitivních buněk je účinnější a vhodnější metoda pro přenos spermatogoniálních buněk a tedy i pro uchování genetických zdrojů u ptáků.

7. ZÁVĚRY A DOPORUČENÍ

V průběhu řešení disertační práce byly testovány následující hypotézy:

1. Pomocí zamrazených testikulárních buněk lze po transplantaci do varlat příjemců obnovit spermatogenezi a produkovat potomstvo s genotypem dárce.
2. Pomocí vybrané populace samčích zárodečných buněk lze po transplantaci do varlat příjemců obnovit spermatogenezi a získat potomstvo s genotypem dárce.

Pro ověření hypotézy 1 bylo dosaženo těchto dílčích výsledků:

- Příprava příjemců na transplantaci dárcovských buněk prostřednictvím lokálního ozařování varlat
- Izolace testikulárních buněk metodou dvoustupňového trávení
- Ověření Dimethylsulfoxidu jako účinného kryoprotektiva pro dlouhodobé uchování testikulárních buněk u kohoutů
- Vývoj zamrazovacího protokolu využívajícího kryoprotektivum Biofreeze
- Porovnání kryoprotektiv Dimethylsulfoxidu a Biofreeze prostřednictvím viability buněk po rozmrazení a pomocí transplantace zamrazených buněk
- Transplantace zamrazených buněk do varlat neplodných příjemců
- Obnova spermatogeneze u 50 % příjemců zamrazených buněk
- Získání potomků s genotypem dárce od 25 % příjemců zamrazených buněk

V rámci ověřování hypotézy 2 se podařilo dosáhnout mimo výše zmíněných výsledků dále:

- Přípravy rekombinantního kuřecího GFR α -1 proteinu
- Získání polyklonální protilátky proti kuřecímu GFR α -1 proteinu pomocí imunizace myší
- Detekce GFR α -1 receptoru u různých populací testikulárních buněk
- Selektce GFR α -1 pozitivních buněk a tím obohacení směsi testikulárních buněk o spermatogoniální buňky
- Transplantace GFR α -1 pozitivních buněk do varlat neplodných příjemců
- Obnova spermatogeneze u jednoho příjemce GFR α -1 pozitivních buněk
- Získání potomků od jednoho příjemce GFR α -1 pozitivních buněk

Jedním ze dvou hlavních cílů této disertační práce bylo ověřit, zda po transplantaci zamrazených testikulárních buněk do varlat neplodného kohouta dojde k obnovení

spermatogeneze a získání potomstva. U poloviny příjemců došlo k produkci zralých spermií a u čtvrtiny příjemců dokonce k vylíhnutí kuřat, která byla jednoznačně potomky dárců buněk. Práce se zabývala porovnáním dvou kryoprotektivních látek - běžně používaného kryoprotektiva Dimethylsulfoxide a komerčního preparátu Biofreeze. Mezi těmito dvěma kryoprotektivy nebyl prokázán rozdíl ani ve viabilitě buněk po rozmrazení ani ve schopnosti rozmrazených buněk osídlit semenotvorný epitel neplodných příjemců. Tímto experimentem bylo jasně prokázáno, že testikulární buňky dospělého kohouta jsou schopné přežít dlouhodobé skladování v tekutém dusíku a po rozmrazení a přenosu do varlat obnovit plně spermatogenezi neplodných kohoutů.

Pro zvýšení účinnosti experimentů doporučujeme optimalizovat zamrazovací protokol pro testikulární buňky, zejména pak zamrazovací protokol využívající komerční preparát Biofreeze. Jak uvádí výrobce, toto medium neobsahuje Dimethylsulfoxide, který je známý pro svou vysokou toxicitu k buňkám. Účinnost transplantací by bylo možné zvýšit také injekcí většího množství dárcovských buněk. Zajímavé výsledky by mohl přinést i experiment srovnávající vliv věku dárců a příjemců.

Metoda kryokonzervace a transplantace testikulárních buněk by mohla sloužit jako alternativa k uchování spermií ohroženého plemene či druhu. Buňky takového vzácného jedince by mohly být odebrány biopsií a zamrazeny v kryobance po neomezeně dlouhou dobu a po rozmrazení přeneseny do varlat blízkého druhu nebo jiného plemene.

Druhým cílem této disertační práce bylo identifikovat GFR α -1 pozitivní buňky ve varleti kohouta a pomocí nich obohatit suspenzi dárcovských buněk o spermatogoniální buňky. Ačkoli byl receptor GFR α -1 identifikován v největší míře u SP populace buněk, která je pravděpodobně nejbohatší na kmenové spermatogonie, kromě toho byl identifikován také u tetraploidních zárodečných buněk a v menší míře i u haploidních buněk. Z dosažených výsledků je zřejmé, že GFR α -1 receptor není úzce specifický výhradně pro kmenové spermatogonie u kohoutů. Přesto se podařilo pomocí vybrané populace GFR α -1 pozitivních buněk obnovit u jednoho příjemce spermatogenezi a získat od něj potomky. Účinnost tohoto experimentu nelze ale objektivně srovnávat s předchozími experimenty, protože nebylo použito dostatečné množství příjemců.

Unikátní marker typický pouze pro kmenové spermatogoniální buňky nebyl objeven prozatím ani u savců. Řešení představuje použití kombinace několika kandidátních markerů. Nutno ovšem podotknout, že jakákoli manipulace se zárodečnými buňkami po izolaci hrubé směsi testikulárních buněk snižuje jejich životnost a šanci na osídlení semenotvorného

epitelu. Pro účely uchování genetických zdrojů se tak prozatím zdá být účinnější transplantace neselektované populace testikulárních buněk.

8. SEZNAM LITERATURY

- ABE, K., HASHIYAMA, M., MACGREGOR, G., YAMAMURA, K. 1996. Purification of primordial germ cells from TNAPbeta-geo mouse embryos using FACS-gal. *Developmental Biology*. 180 (2). 468-472.
- AVARBOCK, M.R., BRINSTER, C.J., BRINSTER, R.L. 1996. Reconstitution of spermatogenesis from frozen spermatogonial stem cells. *Nature Medicine*. 2 (6). 693-696.
- BAKST, M.R., AKUFFO, V., TREFIL, P., BRILLARD, J. P. 2007. Morphological and histochemical characterization of the seminiferous epithelial and Leydig cells of the turkey. *Animal Reproduction Science*. 97 (3-4). 303-313.
- BENESOVA, B., MUCKSOVA, J., KALINA, J., TREFIL, P. 2014. Restoration of spermatogenesis in infertile chicken male after transplantation of cryopreserved testicular cells. *British Poultry Science*. In press DOI: 10.1080/00071668.2014.974506
- BENESOVA, B., TREFIL, P. 2014. Možnosti pro záchranu ohrožených druhů a uchování genetické variability u ptáků. *Veterinářství*. 64 (8). 632-635.
- BENESOVA, B., TREFIL, P. 2012. Uchovávání spermií *in vivo* ve vejcovodu slepic. *Veterinářství*. 63(3). 158-159.
- BLANCO, J. M., GEE, G., WILDT, D. E., DONOGHUE, A. M. 2000. Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. *Biology of Reproduction*. 63 (4). 1164-1171.
- BLESBOIS, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Science Journal*. 63 (2). 213-222.
- BLESBOIS, E., BRILLARD, J. P. 2007. Specific Features of *in vivo* and *in vitro* sperm storage in birds. *Animal*. 1 (10). 1472-1481.
- BLESBOIS, E., SEIGNEURIN, F., GRASSEAU, I., LIMOUZIN, C., BESNARD, J., GOURICHON, D., COQUERELLE, G., RAULT, P., TIXIER-BOICHARD, M. 2007. Semen cryopreservation for *ex situ* management of genetic diversity in chicken: creation of the french avian cryobank. *Poultry Science*. 86 (3). 555 – 564.
- BRINSTER, R.L., AVARBOCK, M.R. 1994. Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *Developmental Biology*. 91 (24). 11303 – 11307.
- 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*. *Developmental Biology*. 91 (24). 11298-11302.
- BRINSTER, R.L., NAGANO, M. 1998. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Cell and Developmental Biology*. 9 (4). 401-409.

- BUAGEAW, A., SUKGWANI, M., BEN-YEHUDAH, A., EHMCKE, J., RAWE, V.Y., PHOLPRAMOOL, CH., ORWIG, K.E., SCHLATT, S. 2005. GDNF Family receptor alpha1 phenotype of spermatogonial stem cells in immature mouse testes. *Biology of Reproduction*. 73 (5). 1011-1016.
- BURROWS, W.H., QUINN, J.P. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*. 16 (1). 19-24.
- CLOUTHIER, D.E., AVARBOCK, M.R., MAIKA, S.D., HAMMER, R.E., BRINSTER, R.L. 1996. Rat spermatogenesis in mouse testis. *Nature*. 381 (6581). 418-421.
- COOKE, J.E., GODIN, I., FFRENCH-CONSTANT, C., HEASMAN, J., WYLIE, C.C. 1993. Culture and manipulation of primordial germ cells. *Methods in Enzymology*. 225. 37-58.
- COOKSEY, E.J., ROTHWELL, B. 1973. The Ultrastructure of the Sertoli cell and its differentiation in the domestic fowl, *Gallus domesticus*. *Journal of Anatomy*. 114 (3). 329-345
- CREEMERS, L.B., MENG, X., den OUDEN, K., van PELT, A.M., IZADYAR, F., SANTORO, M., SARIOLA, H., ROOIJ, D.G. 2002. Transplantation of germ cells from glial cell line-derived neurotrophic factor-overexpressing mice to host testes depleted of endogenous spermatogenesis by fractionated irradiation. *Biology of Reproduction*. 66 (6). 1579-1584.
- ČERNÝ, H. 2005. Anatomie domácích ptáků. Metoda. Brno. 448 s. ISBN 80-239-496-7.
- DAVIDOFF, M.S., MIDDENDORFF, R., KOEVA, Y., PUSCH, W., JEZEK, D., MÜLLER, D. 2001. Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) and its receptors GFRalpha-1 and GFRalpha-2 in the human testis. *Italian Journal of Anatomy and Embryology*. 106 (2). 173-180.
- D'COSTA, S., PETITTE, J.N. 1999. Characterization of stage-specific embryonic antigen-1 (SSEA-1) expression during early development of the turkey embryo. *The International Journal of Developmental Biology*. 43 (4). 349-356.
- DE REVIERS, M. 1968. Détermination de la durée des processus spermatogénétiques chez le coq à l'aide de thymidine tritiée. VI Congrès International de Reproduction Animale et Insemination. Artificielle Paris 1. 183-185.
- DETTIN, L., RAVINDRANATH, N., HOFMANN, M.C., DYM, M. 2003. Morphological characterization of the spermatogonial subtypes in the neonatal mouse testis. *Biology of Reproduction*. 69 (5). 1565-1571.
- DOBRINSKI, I., AVARBOCK, M.R., BRINSTER, R.L. 1999. Transplantation of germ cells from rabbits and dogs into mouse testes. *Biology of Reproduction*. 61(5). 1331-1339.
- DOBRINSKI, I., AVARBOCK, M.R., BRINSTER, R.L. 2000. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Molecular Reproduction and Development*, 57 (3). 270-279.

- DONOGHUE, A. M., WISHART, G. J. 2000. Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*. 62 (1-3). 213-232.
- ETCHES, R. J. 1996. *Reproduction in poultry*. CAB International. Wallingford, UK. pp.318. ISBN 978-0-85198-738-5.
- FOUCHÉCOURT, S., GODET, M., SABIDO, O., DURAND, P. 2006. Glial cell-line-derived neurotrophic factor and its receptors are expressed by germinal and somatic cells of the rat testis. *Journal of endocrinology*. 190 (1). 59-71.
- FRITZ, I., B. 1994. Somatic cell-germ cell relationships in mammalian testes during development and spermatogenesis. *Ciba Foundation Symposium*. 182. 271-274.
- FULTON, J. E. 2006. Avian genetic stock preservation: an industry perspective. *Poultry Science*. 85 (2). 227-231.
- GOOSSENS, E., FREDERICKX, V., BLOCK, G., STEIRTEGHEM, A.C., TOURNAYE, H. 2003. Reproductive capacity of sperm obtained after germ cell transplantation in a mouse model. *Human Reproduction*. 18 (9). 1874-1880.
- HE, Z., KOKKINAKI, M., JIANG, J., DOBRINSKI, I., DYM, M. 2010. Isolation, characterization, and culture of human spermatogonia. *Biology of Reproduction*. 82 (2). 363-372.
- HEDGER, M.P. 2012. Immune privilege of the testis: Meaning, Mechanisms, and Manifestations. In: Stein-Streilein, J. (ed). *Infection, Immune Homeostasis and Immune Privilege*. XII. Hardcover. pp 156. ISBN: 978-3-0348-0444-8.
- HELLER, C.G., CLERMONT, Y. 1963. Spermatogenesis in man: an estimate of its duration. *Science*. 140 (3563). 184-186.
- HERRID, M., OLEJNIK, J., JACKSON, M., SUCHOWERSKA, N., STOCKWELL, S., DAVEY, R., HUTTON, K., HOPE, S., HILL, J.R. 2009. Irradiation enhances the efficiency of testicular germ cell transplantation in sheep. *Biology of Reproduction*. 81 (5) 898-905.
- HEUCKEROOTH, R.O., LAMPE, P.A., JOHNSON, E.M., MILBRANDT, J. 1988. Neurturin and GDNF promote proliferation and survival of enteric neuron and glial progenitors *in vitro*. *Developmental Biology*. 200 (1). 116-129.
- HIEMSTRA, S.J., van der LENDE, T., WOELDERS, H. (2005) The potential of cryopreservation and reproductive technologies for animal genetic resources conservation strategies. [online]. The role of biotechnology. [cit. 2014 – 03 -12]. Dostupné z : <<http://www.fao.org/biotech/docs/hiemstra.pdf>>
- HILL, J.R., DOBRINSKI, I., 2006. Male germ cell transplantation in livestock. *Reproduction, Fertility and Development*. 18 (2). 13-18.
- HOFFMANN, I. 2009. The global plan of action for animal genetic resources and the conservation of poultry genetic resources. *World's Poultry Science Journal*. 65 (2). 286-297.

- HOFMANN, M.C., STOLLE, L.B., DYM, M. 2005. Isolation of male germ-line stem cells; influence of GDNF. *Developmental Biology*. 279 (1). 114-124.
- HONARAMOOZ, A., MEGEE, S.O., DOBRINSKI, I. 2002. Germ cell transplantation in pigs. *Biology of Reproduction*. 66 (1). 21-28.
- HONARAMOOZ, A., BEHBOODI, E., BLASH, S., MEGEES, S.O. 2003a. Germ cell transplantation in goats. *Molecular Reproduction and development*. 64 (4). 422-428.
- HONARAMOOZ, A., BEHBOODI, E., MEGEE, S.O., OVERTON, S.A., GALANTINO-HOMER, H.L., ECHELARD, Y., DOBRINSKI, I. 2003b. Fertility and germline transmission of donor haplotype following germ cell transplantation in immunocompetent goats. *Biology of Reproduction*. 69 (4). 1260-1264.
- HOWARTH, B. 1983. Fertilizing ability of cock spermatozoa from the testis epididymis and vas deferens following intramaginal insemination. *Biology of Reproduction*. 28 (3). 586-590.
- CHALAH, T., SEIGNEURIN, F., BLESBOIS, E., BRILLARD, J. P. 1999. *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo*. *Cryobiology*. 39 (2). 185-191.
- CHALLEN, G.A., LITTLE, M.H. 2006. A Side order of stem cells: the SP phenotype. *Stem Cells*. 24 (1). 3-12.
- IUCN. 2014. Status category summary by major taxonomic group (animals). [online]. The IUCN red list of threatened species. [cit. 2014-08-02]. Dostupné z <http://cmsdocs.s3.amazonaws.com/summarystats/2014_1_Summary_Stats_Page_Document/s/2014_1_RL_Stats_Table3a.pdf>
- IZADYAR, F., MATTHIJS-RIJSENBILT, J.J., den OUDEN, K., CREEMERS, L.B., WOELDERS, H., de ROOIJ, D.G. 2002. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *Journal of Andrology*. 23 (4). 537-545.
- IZADYAR, F., den OUDEN, K., STOUT, T.A.E., STOUT, J., CORET, J., LANKVELD, D.P.K., SPOORMAKERS, T.J.P., COLENBRANDER, B., OLDENBROEK, J.K., van der PLOEG, K.D., WOELDERS, H., KAL, H.B., de ROOIJ, D.G. 2003. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells. *Reproduction*. 126(6). 765-774.
- JALME, M. S., LECOQ, R., SEIGNEURIN, F., BLESBOIS, E., PLOUZEAU, E. 2003. Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the first step towards a cryobank for endangered avian species. *Theriogenology*. 59 (3-4). 875-888.
- JEGOU, B. 1993. The Sertoli-germ cell communication network in mammals. *International review of cytology*. 147. 25-96.
- JONES, R.C., LIN, M. 1993. Spermatogenesis in birds. In: Milligan, S.R. (ed). *Oxford reviews of reproductive biology*. Oxford University Press. Tokyo. 15. 233-264.
- JUDAS, L., BENTZENM S.M., HANSEN, P.V., OVERGAARD, J. 1996. Proliferative

response of mouse stem cells after irradiation: a quantitative model analysis of experimental data. *Cell Proliferation*. 29 (2). 73-78.

JUNG, J.G., KIM, D.K., PARK, T.S., LEE, S.D., LIM, J.M., HAN, J.Y. 2005. Development of novel markers for the characterization of chicken primordial germ cells. *Stem Cells*. 23 (5). 689-698.

JUNG, J.G., LEE, Y.M., PARK, T.S., PARK, S.H., LIM, J.M., HAN, J.Y. 2007. Identification, culture and characterization of germ line stem cell-like cells in chicken testes. *Biology of Reproduction*. 76 (1). 173-182.

KANATSU-SHINOHARA, M., Ogonuki, N., Inoue, K., MIKI, H., OGURA, A., TOYOKUNI, S. 2003a. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biology of Reproduction*. 69 (2). 612-616.

KANATSU-SHINOHARA, M., Ogonuki, N., Inoue, K., OGURA, A., TOYOKUNI, S., HONJO, T., SHINOHARA, T. 2003b. Allogeneic offspring produced by male germ line stem cell transplantation into infertile mouse testis. *Biology of Reproduction*. 68 (1). 167-173.

KANATSU-SHINOHARA, M., Ogonuki, N., Inoue, K., OGURA, A., TOYOKUNI, S., SHINOHARA, T. 2003c. Restoration of fertility in infertile mice by transplantation of cryopreserved male germline stem cells. *Human Reproduction*. 18 (12). 2660-2667.

KINO, K., PAIN, B., LEIBO, S.P., COCHRAN, M., CLARK, M.E., ETCHES, R.J. 1997. Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. *Poultry Science*. 76 (5). 753-760.

KUBOTA, H., AVARBOCK, M.R., BRINSTER, R.L. 2004. Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101 (47). 16489-16494.

LACERDA, S.M.S.N., BATLOUNI, S.R., SILVA, S.B.G., HOMEM, C.S.P., FRANCA, L.R. 2006. Germ cell 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., CAMPOSSILVA, S.M. 2008. Germ cell transplantation in Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cybium*. 32. 115-118.

LAKE, P. E. 1984. The Male in reproduction. In: Freedman, B. M. (ed). *Physiology and biochemistry of the domestic fowl*. Academic Press, London. 5. 381-405.

LASALLE, B., BASTOS, H., LOUIS, J.P., RIOU, L., DUTRILLAX, B., FOUCHET, P., ALLEMAND, I. 2004. Side population cells in adult mouse testis express Bcrp gene and are enriched in spermatogonia and germinal stem cells. *Development*. 131 (2). 479-487.

LEE, Y.A., KIM, Y.H., KIM, B.J., KIM, B.G., KIM, K.J., AUH, J.H., SCHMIDT, J.A., RYU, B.Y. 2013. Cryopreservation in trehalose preserves functional capacity of murine spermatogonial stem cells. *PLoS One*. 8 (1). e54889.

- LIN, M., JONES, R.C. 1992. Renewal and proliferation of spermatogonia during spermatogenesis in the Japanese quail. *Cell and Tissue Research*. 267 (3). 591-601.
- LONG, J. A. 2006. Avian semen cryopreservation: what are biological challenges? *Poultry Science*. 85 (2). 232-236.
- LUKASZWICZ, E., KRUSZYNSKI, W. 2003. Evaluation of fresh and frozen-thawed semen of individual ganders by assessment of spermatozoa motility and morphology. *Theriogenology*. 59 (7). 1627-1640.
- MAJHI, S.K., HATTORI, R.S., YOKOTA, M., WATANABE, S., STRUSSMANN, 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). 1-8
- MARCHAND, C.R., GOMOT, L., de REVIERS, M. 1977. Etude par autoradiographie et marquage à la thymidine tritiée de la durée de la spermatogénèse du canard de barbarie (*Cairina moschata L.*). *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie et de ses Filiales* 171. 931-934.
- MASSIP, A., LEIBO, S., BLESBOIS, E. 2004. Cryobiology and the breeding of domestic animals. In: Benson, E., Fuller, B., Lane, N. (eds). *Life in the Frozen State*. Taylor and Francis Group. London. p. 371 – 392.
- McCARREY, J. R., 1993. In: Desjardins, C., Ewing, L.L. (eds). *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Oxford University Press. New York. pp. 497. ISBN 978-0-19-506269-4.
- McCARREY, J.R., HSU, K.C., EDDY, E.M., KLEVECZ, R.R., BOLEN, J.L. 1987. Isolation of viable mouse primordial germ cells by antibody-directed flow sorting. *Journal of Experimental Zoology*. 242 (1). 107-111.
- MEISTRICH, M.L., van BEEK, M.E.A.B. 1993. Spermatogonial stem cells. In: Desjardins, C., Ewing, L.L. (eds). *Cell and Molecular Biology of the Testis*. Oxford University Press. New York. 256-295.
- MEISTRICH, M.L., HUNTER, N.R., SUZUKI, N., TROSTLE, P. K., WITHERS, H.R. 1978. Gradual regeneration of mouse testicular stem cells after exposure to ionizing radiation. *Radiation Research*. 74 (2). 349-362.
- MENG, X., LINDHAHL, M., HYVONEN, M.E., PARVINEN, M., de ROOIJ, D.G., HESS, M.W., RAATIKAINEN-AHOKAS, A., SAINIO, K., RAUVALA, H., LAKSO, M., PICHEL, J.G., WESTPHAL, H., SAARMA, M., SARIOLA, H. 2000. Regulation of cell fate decision of undifferentiated spermatogonia by GDNF. *Science*. 287 (5457). 1489-1493.
- MUCKSKOVÁ, J., BRILLARD, J. P., HEJNAR, J., POPLŠTEIN, M., KALINA, J., BAKST, M. R., YAN, H., TREFIL, P. 2009. Identification of various testicular cell populations in pubertal and adult cockerels. *Animal Reproduction Science*. 114 (4). 415-422.
- MUCKSOVA, J., KALINA, J., BAKST, M., YAN, H., BRILLARD, J.P., BENESOVA, B., FAFÍLEK, B., HEJNAR, J. & TREFIL, P. 2013. Expression of the chicken GDNF family

- receptor α -1 as a marker of spermatogonial stem cells. *Animal Reproduction Science*. 142 (1-2). 75-83.
- NAGANO, M., MCCARREY, J.R., BRINSTER, R.L. 2001. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testes. *Biology of Reproduction*. 64 (5). 1409-1416.
- NAGLER, J.J., CLOUD, J.G., WHEELER, P.A., THORGAARD, G.H. 2001. Testis transplantation in male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Biology of Reproduction*. 64 (2). 644-646.
- NAITO, M., TAJIMA, A., TAGAMI, T., YASUDA, Y., KUWANA, T. 1994. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *Journal of Reproduction and Fertility*. 102 (2). 321-325.
- NOIRAUULT, J., BRILLARD, J.P., BAKST, M.R. 2006. Spermatogenesis in the turkey (*Meleagris gallopavo*): quantitative approach in immature and adult males subjected to various photoperiods. *Theriogenology* 65 (4). 845-859.
- OGAWA, T., DOBRINSKI, I., AVARBOCK, M.R., BRINSTER, R.L. 1999. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes. *Biology of Reproduction*. 60 (2). 515-521.
- 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.
- PARKES, A.S., SMITH, A.U. 1954. Storage of testicular tissue at very low temperatures. *British Medical Journal*. 1 (4857). 315-316.
- PEREIRA, R.J., NAPOLITANO, A., GARCIA-PEREIRA, F.L., BALDO, C.F., SUHR, S.T., KING, L.E., CIBELLI, J.B., KARCHER, D.M., MCNIEL, E.A., PEREZ, G.I. 2013. Conservation of avian germplasm by xenogeneic transplantation of spermatogonia from sexually mature donors. *Stem Cells and Development*. 22 (5). 735-749.
- PETITTE, J.N. 2006. Avian germplasm preservation: embryonic stem cells or primordial germ cells? *Poultry Science*. 85 (2). 237-242.
- PINON-LATAILLADE, G., VIGUIER-MARTINEZ, M.C., TOUZALIN, A.M., MAAS, J., JEGOU, B. 1991. Effect of an acute exposure of rat testes to gamma rays on germ cells and on Sertoli and Leydig cell functions. *Reproduction, Nutrition, Development*. 31(6). 617-628.
- POLGE, C., SMITH, A.U., PARKES, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164 (4172). 666.
- ROSSI, P., SETTE, C., DOLCI, S., GEREMIA, R. 2000. Role of c-Kit in mammalian spermatogenesis. *Journal of endocrinological investigation*. 23 (9). 609-615.

- RÖNNSTRAND, L. 2004. Signal transduction via the stem cell factor receptor/c-Kit. Cellular and molecular life sciences. 61 (19-20). 2535-2548.
- RUSSEL, L.D., ETTIN, R.A., HIKIM, A.P., CLEGG, E.D. 1990. Histological and histopatological evaluation of the testis. Cache River Press. Clearwater. Florida. p. 286. ISBN 0-9627422-20-1.
- SANG, H. 2004. Prospect for transgenesis in the chick. Mechanisms of Development. 121 (9). 1179-1186.
- SCHLATT, S., ROSIEN, 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.
- SCHLATT, S., FOPPIANI, L., ROLF, C., WEINBAUER, G.F., NIESCHLAG, E. 2002. Germ cell transplantation into X-irradiated monkey testes. Human Reproduction. 17 (1). 55-62.
- SCHRANS-STASSEN, B.H.G.J., van de KANT, H.J.G., de ROOIJ, D.G., van PELT, A.M.M. 1999. Differential expression of c-Kit in mouse undifferentiated and differentiating type A spermatogonia. Endocrinology. 140 (12). 5894-5900.
- SHINOHARA, T., AVARBOCK, M.R. BRINSTER, R.L. 1999. Beta1- and alpha6-integrin are surface markers on mouse spermatogonial stem cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 96 (10). 5504-5509.
- SHINOHARA, T., ORWIG, K.E., AVARBOCK, M.R., BRINSTER, R.L. 2000. Spermatogonial stem cell enrichment by multiparameter selection of mouse testis cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97 (15). 8346-8351.
- SHINOHARA, T., INOUE, K., OGONUKI, N., KANATSU-SHINOHARA, M., MIKI, H., NAKATA, K., KUROME, M., NAGASHIMA, H., TOYOKUNI, S., KOQISHI, K., HONJO, T., OQURA, A. 2002. Birth of offspring following transplantation of cryopreserved immature testicular pieces and *in vitro* insemination. Human Reproduction. 17 (12). 3039-3045.
- SKINNER, M. 1991. Cell-cell interaction in the testis. Endocrine Reviews. 12 (1). 45-77.
- SMÝKALOVÁ, S., KOTRBOVÁ, A., TREFIL, P. 1998. Effect of busulphan on growth and development of the chicken embryos. Veterinary Medicine Czech. 43(4). 105-109.
- SONG, Y., D'COSTA, S., PARDUE, S.L., PETITTE, J.N., 2005. Production of germline chimeric chickens following the administration of a busulphan emulsion. Molecular Reproduction and Development. 70 (4). 438-444.
- SONG, Y., SILVERSIDES, F.G. 2007a. Heterotopic transplantation of testes in newly hatched chickens and subsequent production of offspring via intramaginal insemination. Biology of Reproduction. 76 (4). 598-603.

- SONG, Y., SILVERSIDES, F.G. 2007b. Production of offspring from cryopreserved chicken testicular tissue. *Poultry Science*. 86 (7). 1390-1396.
- SUTER-CRAZZOLARA, C., UNSICKER, K. 1994. GDNF is expressed in two forms in many tissues outsider the CNS. *Neuroreport*. 5 (18). 2486-2488.
- SUVANTO, P., HILTUNEN, J.O., ARUMAE, U., MOSHNYAKOV, M., SARIOLA, H., SAINIO, K., SAARMA, M. 1996. Localization of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in embryonic rat by *in situ* hybridization. *European Journal of Neurosciences*. 8 (4). 816-822.
- TADOKORO, Y., YOMOGIDA, K., OHTA, H., TOHDA, A., NISHIMUNE, Y. 2002. Homeostatic regulation of germinal stem cell proliferation by the GDNF/FSH pathway. *Mechanisms of Development*. 113 (1). 29-39.
- TAJIMA, A., NAITO, M., YASUDA, Y., KUWANA, T. 1998. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *The Journal of Experimental Zoology*. 280 (3). 265-267.
- TEGELENBOSCH, R.A., de ROOIJ, D.G. 1993. A quantitative study of spermatogonial multiplication and stem cell renewal in the C3H/101 F1 hybrid mouse. *Mutation Research*. 290 (2). 193-200.
- THURSTON, R. J., HESS, B. L. 1987. Ultrastructure of spermatozoa from domesticated birds: a comparative study of turkey, chicken and guinea fowl. *Scanning Microscopy*. 1(4). 1829-1838.
- THURSTON, R.J., KORN, N. 2000. Spermiogenesis in commercial poultry species: anatomy and control. *Poultry Science*. 79 (11). 1650-1668.
- TREFIL, P., POLAK, J., POPLSTEIN, M., MIKUS, T., KOTRBOVÁ, A., ROZINEK, J. 2003. Preparation of fowl testes as recipient organs to germ-line chimeras by means of gamma-radiation. *British Poultry Science*. 44 (4). 643-650.
- TREFIL, P., MICA KOVA, A., MUCKSOVA, J., HEJNAR, J., POPLSTEIN, M., BAKST, M.R., KALINA, J., BRILLARD, J.P. 2006. Restoration of spermatogenesis and male fertility by transplantation of dispersed testicular cells in the chicken. *Biology of Reproduction*. 75 (4). 575-581.
- TRUPP, M., RYDEN, M., JORNVALL, H., FUNAKOSHI, H., TIMMUSK, T., ARENAS, E., IBANEZ, C.F. 1995. Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *Journal of Cell Biology*. 130 (1). 137-148.
- TREFIL, P., BAKST, M.R., YAN, H., HEJNAR, J., KALINA, J., MUCKSOVA, J. 2010. Restoration of spermatogenesis after transplantation of c-Kit positive testicular cells in the fowl. *Theriogenology*. 74 (9). 1670-1676.
- TSELUTIN, K., SEIGNEURIN, F., BLESBOIS, E. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Science*. 78 (4). 586 – 590.

- URVEN, L.E., ERICKSON, C.A., ABBOTT, U.K., McCARREY, J.R. 1988. Analysis of germ-line development in the chick embryo using an anti-mouse EC cell antibody. *Development*. 103 (2). 299-304.
- URVEN, L.E., ABBOTT, U.K., ERICKSON, C.A. 1989. Distribution of extracellular matrix in the migratory pathway of avian primordial germ-cells. *Anatomical Record*. 224 (1). 14-21.
- VAN DER WEE, K.S., JOHNSON, E.W., DIRAMI, G., DYM, T.M., HOFMANN, M.C. 2001. Immunomagnetic isolation and long term culture of mouse type A spermatogonia. *Journal of Andrology*. 22 (4). 696-704.
- VAN PELT, A.M., MORENA, A.R., VAN DISSEL-EMILIANI, F.M., BOITANI, C., GAEMERS, I.C., DE ROOIJ, D.G., STEFANINI, M. 1996. Isolation of the synchronized A spermatogonia from adult vitamin A-deficient rat testes. *Biology of Reproduction*. 55 (2). 439-444.
- VAN PELT, A.M., ROEPERS-GAJADIEN, H.L., GADEMAN, I.S., CREEMERS, L.B., DE ROOIJ, D.G., VAN DISSEL-EMILIANI, F.M. 2002. Establishment of cell lines with rat spermatogonial stem cell characteristics. *Endocrinology*. 143 (5). 1845-1850.
- VICK, L., LI, Y., SIMKISS, K. 1993. Transgenic birds from transformed primordial germ cells. *Proceedings Biological Science*. 251 (22). 179-182.
- WANG, Y., CHANG, C.F., MORALES, M., CHIANG, Y.H., HOFFER, J. 2002. Protective effects of glial cell line-derived neurotrophic factor in ischemic brain injury. *Annals of the New York Academy of sciences*. 962. 423-437.
- WOELDERS, H., ZUIDBERG, C.A., HIEMSTRA, S.J. 2006 Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective. *Poultry Science*. 85(2). 216-222.
- YOMOGIDA, K., YAGURA, Y., NISHIMUNE, Y. 2003. Dramatic expansion of germinal stem cells by ectopically expressed human glial cell line-derived neurotrophic factor in mouse Sertoli cells. *Biology of Reproduction*. 69 (4). 1303-1307.
- ZAMBROWICZ, B.P., IMAMOTO, A., FIERING, S., HERZENBERG, L.A., KERR, W.G., SORIANO, P. 1997. Disruption of overlapping transcripts in the ROSA β geo26 gene trap strain leads to widespread expression of β -galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* . 94 (8). 3789-3794.
- ZHANG, Z., RENFREE, M.B., SHORT, R.V. 2003. Successful intra and interspecific male germ cell transplantation in the rat. *Biology of Reproduction*. 68 (3). 961-967.

9. PŘÍLOHY

Příloha 1

BENESOVA, B., MUCKSOVA, J., KALINA, J., TREFIL, P. 2014. Restoration of spermatogenesis in infertile chicken male after transplantation of cryopreserved testicular cells. British Poultry Science. In press DOI: 10.1080/00071668.2014.974506

Příloha 2

BENESOVA, B., TREFIL, P. 2014. Možnosti pro záchranu ohrožených druhů a uchování genetické variability u ptáků. Veterinářství. 64 (8). 632-635.

Příloha 3

MUCKSOVA, J., KALINA, J., BAKST, M., YAN, H., BRILLARD, J.P., BENESOVA, B., FAFILEK, B., HEJNAR, J., TREFIL, P. 2013. Expression of the chicken GDNF family receptor α -1 as a marker of spermatogonial stem cells. Animal Reproduction Science. 142(1-2). 75-83

Příloha 4

BENESOVA, B., TREFIL, P. 2012. Uchovávání spermií *in vivo* ve vejcovodu slepic. Veterinářství. 63(3). 158-159.