

OPRACOWANIE EFEKTYWNEJ STRATEGII WYPROWADZANIA STABILNYCH MITOTYCZNIE LINII BLASTODERMALNO-POCHODNYCH ZARODKOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH Z ZAPŁODNIONYCH JAJ KURY DOMOWEJ (*GALLUS GALLUS DOMESTICUS*)

Marcin Samiec^{1*}, Monika Trzcńska^{1*}, Katarzyna Połtowicz², Małgorzata Duda³

¹Institut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji, 32-083 Balice k. Krakowa

²Institut Zootechniki – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Hodowli Drobiu, 32-083 Balice k. Krakowa

³Uniwersytet Jagielloński, Instytut Zoologii i Badań Biomedycznych, Zakład Endokrynologii, 30-387 Kraków

E-mail: marcin.samiec@iz.edu.pl; E-mail: monika.trzcinska@iz.edu.pl;

E-mail: maja.duda@uj.edu.pl

*Marcin Samiec i Monika Trzcńska przyczynili się do powstania tego artykułu naukowego w jednakowym stopniu (równy wkład autorski).

ORCID

Marcin Samiec ID: <https://orcid.org/0000-0002-4060-1893>

Monika Trzcńska ID: <https://orcid.org/0000-0001-9758-1304>

Katarzyna Połtowicz ID: <https://orcid.org/0000-0002-7931-4111>

Małgorzata Duda ID: <https://orcid.org/0000-0003-0100-7979>

Niniejsza praca naukowa uzyskała finansowanie ze środków zadania badawczego nr 04-19-13-11 w ramach Funduszu Badań Własnych Instytutu Zootechniki – Państwowego Instytutu Badawczego (IZ-PIB).

Abstrakt

*Pluripotentne blastodermalno-pochodne embrionalne komórki macierzyste (B-ESCs), izolowane z zarodków kury domowej (*Gallus gallus domesticus*) w stadium X, stanowią nie tylko nowatorski model do badania rozwoju zarodkowego ptaków, ale także nabierają coraz większego znaczenia tak w kontekście ochrony różnych populacji poza ich naturalnym środowiskiem, jak zachowania genetycznej różnorodności gatunków i ras ptaków hodowlanych. Głównym celem niniejszej pracy było opracowanie wydajnego protokołu: (1) izolacji kurzych komórek BCs; (2) uzyskiwania z nich stabilnych linii zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) w warunkach *ex ovo*; oraz (3) określenia profilu proteomicznego komórek B-ESCs na podstawie wybranych biomarkerów pluripotencji, tj. czynników transkrypcyjnych Oct-3/4 (ang. octamer-binding transcription factor-3/4) i Sox2 (ang. sex-determining region Y (SRY)-box 2). Komórki BCs, po izolacji z zapłodnionych jaj w stadium X, były namnażane *ex ovo*, w celu wyprowadzenia stabilnych linii blastodermalno-pochodnych komórek ESCs. Podczas długotrwałej hodowli *in vitro* komórek B-ESCs, obejmującej co najmniej 15 pasaży, analizowano ich zdolności adhezyjne i proliferacyjne w zależności od stosowanych naczyn hodowla-*

nych. Detekcję obecności specyficznych białkowych markerów pluripotencji (*Oct-3/4* i *Sox2*) przeprowadzono w oparciu o zastosowanie metod Western-blot oraz barwienia immunofluorescencyjnego. Wykazano, że w trakcie długookresowej hodowli, blastodermalno-pochodne komórki ESCs kury domowej zachowywały morfologię typową dla zarodkowych komórek macierzystych. Potwierdzono także ekspresję wybranych biomarkerów pluripotentnego fenotypu macierzystego komórek wskutek identyfikacji proteomicznego i immunofluorescencyjnego profilu dwóch przedstawicieli rodziny homeotycznych czynników transkrypcyjnych (*Oct-3/4* i *Sox2*), zawierających wysoce konserwatywną homeodomenę wiążącą DNA, z charakterystycznym 60-aminokwasowym motywem heliks-skręt-heliks. Z przeprowadzonych badań jednoznacznie wynika, że wykorzystanie 8-komorowych szklanych mikropłytek Ibidi z powierzchnią pokrytą syntetycznym substratem polimerowym – poli-L-lizyną oraz szalek hodowlanych z plastiku polistyrenowego z dnem pokrytym kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes) istotnie wpływa na zdolności proliferacyjne linii komórek B-ESCs kury domowej.

Słowa kluczowe: kura domowa, komórki blastodermalne, zarodkowe komórki macierzyste, markery pluripotencji, homeotyczne czynniki transkrypcyjne, Oct-3/4, Sox2

Wstęp

Badania ukierunkowane na wyprowadzanie oraz kriogeniczne zabezpieczanie linii komórkowych pochodzenia zarodkowego stopniowo stają się i mogą stanowić w stosunkowo nieodległej przyszłości immanentny element biotechnologicznie wspomaganą ochrony *ex situ* oraz genetycznego ratowania różnych gatunków i ras ptaków hodowlanych, w tym kury domowej (*Gallus gallus domesticus*) (Carsience i in., 1993; Blackburn, 2006; Hu i in., 2022). Ponadto opracowanie systemów *ex ovo*, pozwalających na zachowanie stabilnych warunków cytokinetycznych, które generują mikrośrodowisko mitogenne i antycytostatyczne sprzyjające stymulacji aktywności proliferacyjnej komórek pochodzenia embrionalnego (np. blastodermalno-pochodnych komórek macierzystych lub pierwotnych komórek płciowych), wytycza całkiem alternatywny kierunek w stosunku do modeli badawczych *ex vivo*, opartych na hodowli linii komórek fibroblastycznych układu skórno-powłokowego lub linii mezenchymalnych komórek macierzystych wywodzących się z tkanek i organów młodocianych lub dojrzałych płciowo ptaków udomowionych (Wu i in., 2008; Guan i in., 2010; Na i in., 2010; Bai i in., 2011, 2013; Nandi i in., 2016; Svoradová i in., 2018). Dlatego też, zniesione około 24 godziny po zapłodnieniu, jaja kury domowej stanowią doskonały biorezerwuar subpopulacji komórek blastodermalnych (BCs; ang. *blastodermal cells*) wywodzących się z tarczki zarodkowej (embriodysku), które w jajach poli- i telolecytalnych ptaków prowadzą do powstania w wyniku bruzdkowania częściowego tarczkowego (meroblastycznego) – w obrębie bieguna animalnego (twórczego) jaj – zarodków w stadiach blastuli/dyskoblastuli lub gastruli. Wyizolowane komórki blastodermi są z kolei, idealnym źródłem, z którego wyprowadzane mogą być stabilne mitotycznie, permanentne linie zarodkowych komórek macierzystych, tj. pierwotnych komórek zarodkowych (ESCs; ang. *embryonic stem cells*) kury domowej (Petitte i in., 1990, 2004; Xiong i in., 2020). Wymierną korzyścią wynikającą z kompleksowego wdrażania rozwiązań z zakresu gatunkowo-specyficznej biotechnologii reprodukcyjnej oraz genetycznej inżynierii embrionalnej opartej na wyprowadzaniu, pozaustrojowej hodowli oraz kolekcjonowaniu *ex ovo* blastodermalno-pochodnych komórek ESCs (ang. *blastoderm-derived ESCs*; B-ESCs) jest trwałe zachowanie biotechnologicznej ochrony *ex situ* oraz zwiększenie poziomu bioróżnorodności genotypowej rzadkich, rodzimych ras zachowawczych wybranych gatunków ptaków hodowlanych, w tym kury domowej (Samiec i Trzcńska, 2022; Sun i in., 2022).

Biorąc pod uwagę wszystkie wyżej wymienione agrobiotechnologiczne, biologiczne, zootechniczne oraz gatunkowo-specyficzne uwarunkowania ornitologiczne, nadrzędnym celem podjętych prac badawczych było opracowanie i optymalizacja nowych procedur badawczych sprofilowanych na stworzenie modelu *in vitro* dla potrzeb:

- 1) izolacji komórek BCs z zapłodnionych jaj kury domowej;
- 2) wyprowadzania *ex ovo* stabilnych linii komórek ESCs z wyizolowanych subpopulacji komórek BCs;
- 3) namnażającej hodowli *in vitro* wyprowadzonych linii komórek ESCs pochodzenia blastodermalnego (B-ESCs);
- 4) określenia profilu proteomicznego wybranych biomarkerów pluripotencji (Oct-3/4, Sox2) w stabilnych mitotycznie liniach komórek B-ESCs.

Material i metody

1. Izolacja komórek BCs z tarczki zarodkowych zapłodnionych jaj kury domowej, wyprowadzanie hodowli pierwotnych i linii blastodermalno-pochodnych komórek ESCs (B-ESCs) oraz określenie ich parametrów cytokinetycznych w zależności od zastosowania różnych rodzajów naczyń hodowlanych

W ramach przeprowadzonych eksperymentów zapłodnione jaja przechowywano do czasu izolacji komórek BCs w pomieszczeniu schłodzonym do temperatury 17-18°C. Bezpośrednio przed izolacją komórek BCs, jaja przemywano 70% etanolem w celu zachowania warunków jałowych. Tarczki zarodkowe izolowano z jaj w X stadium rozwoju embrionalnego, z wykorzystaniem krążków bibułki filtracyjnej. W każdym z 3 powtórzeń eksperymentalnych użyto 15 zapłodnionych jaj. Po izolacji, tarczki spłukiwano do sterylnych 15-mL stożkowych probówek wirowniczych przy użyciu 1×PBS (bez jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} ; CMF-PBS; ang. *calcium/magnesium-free phosphate-buffered saline*; pH 7,2). Wykorzystując sterylne pipety pasteurowskie, mechanicznie rozpraszano komórki w celu uzyskania jednorodnej zawiesiny. Następnie uzyskaną zawiesinę komórkową wirowano przez 10 minut ze względnym przyspieszeniem odśrodkowym 90×g, w temperaturze pokojowej. Po usunięciu supernatantu uzyskany precypitat komórkowy zawieszano w 5 mL pożywki hodowlanej Eagle'a w modyfikacji Dulbecco (DMEM; ang. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Sigma-Aldrich, Merck), wzbogaconej 1,5% surowicy płodów bydłych (FBS; ang. *fetal bovine serum*; Sigma-Aldrich, Merck), 2,0% (v/v) suplementu B-27™ Plus (ThermoFisher Scientific; wolny od surowicy, zdefiniowany chemicznie suplement nowej generacji zawierający m.in. antyoksydanty i składniki troficzno-energetyczne, który zapewnia najwyższy wskaźnik przeżywalności *in vitro*, a także zachowanie wysokiej aktywności proliferacyjnej oraz zdolności do samoodnawiania i utrzymania niezróżnicowanego statusu zarodkowych komórek macierzystych w warunkach hodowli jednowarstwowej), 2,0 μL/mL SCF (ThermoFisher Scientific; polipeptydowy czynnik wzrostu komórek macierzystych; ang. *stem cell factor*) oraz koktajlem antybiotykowym penicyliny i streptomycyny (Pen-Strep; Sigma-Aldrich, Merck). Wzbogacenie pożywki przeznaczonej do hodowli namnażającej, stabilizującej podziały mitotyczne i podtrzymującej niezróżnicowany fenotyp, charakter macierzysty i samoodnawialność komórek B-ESCs poprzez jednoczesną suplementację 1,5% FBS (obfitujący w mitogeny suplement niezdefiniowany chemicznie o drastycznie zredukowanej koncentracji z 10,0% do 1,5%) oraz 2,0% B-27™ Plus (suplement zdefiniowany chemicznie, dedykowany specyficznym wymaganiom pierwotnych komórek zarodkowych) było podyktowane unikatowymi cechami cytokinetycznymi i molekularnymi blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych oraz danymi literaturowymi (Vanhoutteghem i in., 2004; Horiuchi i in., 2006; Zhang i in., 2018). Ponadto właściwy dobór dawek stężeniowych oraz odpowiedni stosunek ilościowy

(struktura rozkładu koncentracji) obu suplementów (1,5% FBS; 2,0% B-27TM Plus) zapewniły łącznie komplementarne i synergistyczne oddziaływanie obu wieloskładnikowych czynników multimitogennych na parametry cytofizjologiczne komórek B-ESCs i utrwalenie molekularnych właściwości towarzyszących zablokowaniu ich zdolności do strukturalno-funkcjonalnego przeprogramowania i cytodyferencjacji w warunkach *ex ovo* (Couteaudier i in., 2015; Zhang i in., 2018; Xiong i in., 2020).

Koncentrację wysiewanych komórek w 1 mL zawiesiny określano przy użyciu elektronicznego licznika komórek TC20TM Automated Cell Counter. Komórki blastodermalne wysiewano do naczyń hodowlanych w gęstości 3×10^5 komórek/mL, inicjując hodowlę pierwotne komórek B-ESCs, z których po przeprowadzaniu pasaży prowadzących do podwojenia subpopulacji komórkowych wyprowadzono stabilne mitotycznie linie/szczepy zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) (minimum 15 pasaży). Hodowlę komórek B-ESCs prowadzono w inkubatorze o ściśle określonych warunkach termiczno-atmosferycznych (38°C, 5% CO₂ w powietrzu, maksymalna wilgotność względna).

W celu ustalenia optymalnych warunków hodowli wykorzystano różne naczynia hodowlane oraz różne typy substratów pokrywających denne części naczyń hodowlanych. Dlatego też układ doświadczalny obejmował dwie serie eksperymentów. W pierwszej serii eksperymentów hodowle komórkowe były zakładane i przeprowadzane w następujących naczyniach hodowlanych: i) butelki hodowlane SPL Life Sciences Cell Culture Flasks (o pojemności 25 cm²) z substratem polistyrenowym (ryc. 1A); ii) butelki hodowlane NuncTMEasYFlaskTM Cell Culture Flasks (o pojemności 25 cm²) z substratem polistyrenowym o powierzchni dennej typu Δ, zwiększającej adherentność i siły przyciągania elektrostatycznego komórek do podłoża (ryc. 1B); oraz iii) sterylne, wysokościennne mikropłytki 8-komorowe Ibidi z dnem szklanym powlekanym syntetycznym substratem polimerowym – poli-L-lizyną (μ-Slide 8 Well high Poly-L-Lysine) (ryc. 1C). Z kolei w drugiej serii eksperymentów hodowle komórkowe były zakładane i przeprowadzane w polistyrenowych szalkach hodowlanych o średnicy 60 mm, z podłożem powlekanym kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL CoatTM Collagen Type I Coated Dishes) (ryc. 1D). Dokumentację mikrofotograficzną hodowanych komórek B-ESCs prowadzono w mikroskopie odwróconym (Nikon Ti-U), wyposażonym w kamerę Nikon DS-Fi1c-U3 (Tokio, Japonia). Po przeprowadzeniu oceny parametrów cytokinetycznych (zdolności do adhezji i proliferacyjnego wzrostu komórek oraz ich zdolności do osiągnięcia pełnej konfluencji i inhibicji kontaktowej) wyprowadzone linie blastodermalno-pochodnych komórek ESCs zabezpieczono kriogenicznie w kontenerach wypełnionych ciekłym azotem (LN₂).

2. Ocena aktywności proliferacyjnej blastodermalno-pochodnych komórek ESCs z zastosowaniem analogu nukleotydowego (BrdU)

Do oszacowania potencjału proliferacyjnego komórek wykorzystano zestaw odczynników dla kolorymetrycznego testu proliferacji, zależnego od 5-bromo-2'-deoksyurydyny (BrdU; Roche, REF 11647229001) (Kolb i in., 1999; Liboska i in., 2012). W celu przygotowania roztworu testowego rozpuszczono 7,1 μL BrdU w 710 μL pożywki hodowlanej. W dalszej kolejności na każdy dołek hodowlany (z wyjątkiem próby kontrolnej) płytki 96-dołkowej z wysianymi 24 godziny wcześniej komórkami (10 000 komórek/100 μL medium hodowlanego/dołek) oraz do próby ślepej dodano po 10 μL tego roztworu i inkubowano 2 godziny. Po upływie tego czasu każdy z roztworów testowych usunięto z dołków, płytkę odsączono na bibule i wstawiono do suszarki (60°C, 1 godz.). Następnie dodano po 200 μL buforu utrwalająco-denaturującego FixDenat na dołek i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 30 minut. W tym czasie rozpuszczono specyficzne przeciwciała anti-BrdU, skoniugowane z cząsteczkami enzymu peroksydazy POD (koniugaty anti-BrdU-POD) w 1,1 mL H₂O; 100 μL

tego roztworu rozpuszczono w 10 mL roztworu do rozcieńczania przeciwciał (*Antibody dilution solution*). Po upływie 30 minut usunięto roztwór, osuszono płytkę na bibule i dodano po 100 μ L na dołek rozcieńczonego roztworu przeciwciał anti-BrdU, sprzężonych z peroksydazą (anti-BrdU-POD) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 90 minut. W tym czasie rozcieńczono 10 mL buforu do przepłukiwania próbek (*Washing buffer*) przez dodanie 90 mL H₂O. Następnie odpłukano przeciwciała 3 razy po 100 μ L na dołek przez dodanie rozcieńczonego buforu do przemywania (*Washing buffer*) – za każdym razem z płytki wytrząsnęto roztwór i osuszono ją na bibule. Kolejno dodano po 100 μ L na dołek roztworu substratowego (*Substrate solution*) i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 10 minut. Po tym czasie zmierzono absorbancję przy użyciu spektrofotometru ThermoScientific Varioscan LUX, korzystając z programu SkanIt Software 7.0 RE. W programie ustawiono wartości odczytu/detekcji absorbancji przy długościach fali absorpcyjnej/wzbudzającej i emitowanej, odpowiednio: $\lambda_{ab/ex} = 370$ nm i $\lambda_{em} = 492$ nm, a odczyt wykonano w 10 i 15 minucie od dodania roztworu substratowego (*Substrate solution*).

2.1. Analiza statystyczna wyników prac eksperymentalnych z wykorzystaniem BrdU-zależnego, kolorymetrycznego testu proliferacji hodowanych in vitro komórek B-ESCs

Analizę statystyczną danych wykonano w programie Microsoft Excel 365 z dodatkiem do analiz statystycznych Analysis ToolPak. Od wartości absorbancji dla powtórzeń technicznych odjęto wartość absorbancji dla medium (próba ślepa). Usunięto skrajne wyniki – jedną wartość maksymalną i jedną minimalną – w celu zmniejszenia odchylenia standardowego. Następnie, obliczono średnie wartości absorbancji przy długościach fal $\lambda_{ab/ex} = 370$ nm oraz $\lambda_{em} = 492$ nm dla powtórzeń technicznych, a następnie średnie wartości dla powtórzeń biologicznych. Uzyskane w ten sposób wartości absorbancji przy długości fali emitowanej $\lambda_{em} = 492$ nm odjęto od absorbancji przy długości fali absorpcyjnej $\lambda_{ab/ex} = 370$ nm. Obliczono odchylenia standardowe. Przeprowadzono analizę różnic statystycznych przy zastosowaniu testu *t*-Studenta, w którym przyjęto, że poziom istotności statystycznej jest równy wartości 0,05 ($\alpha=0,05$). Zmierzone wartości absorbancji dla prób kontrolnych (komórki + koniugaty przeciwciał z peroksydazą anti-BrdU-POD) były na poziomie absorbancji dla prób ślepych (medium hodowlane + BrdU + koniugaty przeciwciał z peroksydazą anti-BrdU-POD), co świadczy o specyficznym działaniu użytych przeciwciał.

3. Western-blot-zależna analiza profilu proteomicznego komórek B-ESCs w kierunku potwierdzenia ich charakteru macierzystego oraz stopnia pluripotencji w oparciu o identyfikację ekspresji markerowych białek Sox2 i Oct-3/4 z grupy homeotycznych czynników transkrypcyjnych

3.1. Izolacja białka całkowitego z blastodermalno-pochodnych komórek ESCs

W celu izolacji białka całkowitego z komórek B-ESCs hodowanych z wykorzystaniem szkiełek hodowlanych μ -Slide 8 Well high Poly-*L*-Lysine oraz szalek hodowlanych SPL LifeScience SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dish usuwano pożywkę z naczyń hodowlanych. Następnie po trzykrotnym przepłukaniu komórek w roztworze PBS do dołków hodowlanych deponowano bufor przeznaczony do lizy komórek i ekstrakcji białka całkowitego z komórek – RIPA (ang. *Radioimmunoprecipitation Assay*; ThermoFisher Scientific) oraz inhibitory proteaz (10 μ L/mL buforu do lizy; Sigma-Aldrich, Merck). Naczynia hodowlane umieszczano na lodzie w celu przeprowadzenia cytolizy, a po upływie 5 minut dokonywano mechanicznego odseparowania adherentnych komórek od podłoża pokrytego substratem polimerowym (poli-*L*-lizyną) lub substratem kolagenowym, za pomocą skrobaka do komórek

(Biologix Group Limited). Otrzymaną zawiesinę komórkową przenoszono do stożkowych mikroprobówek wirowniczych, a w dalszej kolejności próbki poddawano ultradźwiękowej dezintegracji (lizie i ekstrakcji) oraz homogenizacji komórek, tj. sonifikacji/sonikacji, poprzez trzykrotne generowanie 5-sekundowych ultradźwięków o napięciu 50 V. Po zakończonej sonifikacji, próbki pozostawiano na lodzie przez okres 10 minut, a następnie ultrawirovano z prędkością 15 000 rpm przez 15 minut w temperaturze +4°C. Supernatanty z wyizolowanym białkiem całkowitym zamrażano w temperaturze -80°C.

3.2. Pomiar stężenia białka całkowitego metodą Lowry'ego

Stężenie białka całkowitego w rozmrożonych próbkach oznaczano z użyciem zestawu DC™ Protein Assay Kit II (BioRad Laboratories) poprzez zastosowanie metody Lowry'ego, której mechanizm polega na przeprowadzeniu chemicznych reakcji redukcji wartościowości kationów miedzi w związkach kompleksowych z poziomu utlenienia Cu^{2+} do Cu^+ . Efektem zmiany stopnia oksydacji miedzi jest powstanie niebieskiego zabarwienia próbek. Intensywność zabarwienia próbek określano z użyciem spektrofotometru o długości fali promieniowania emitowanego równej 750 nm ($\lambda_{\text{em}}=750$ nm). Krzywą wzorcową sporządzano z roztworów albuminy surowicy bydłowej (BSA; Sigma-Aldrich, Merck) w buforze RIPA. Próbkę standardową przenoszono do 96-dółkowych płytek mikrofitracyjnych. Za pomocą czytnika do płytek Infinite® F50 (Tecan Group Ltd.) dokonywano pomiaru absorbancji przy $\lambda_{\text{em}}=750$ nm. Stężenie białka w badanych próbkach określano na podstawie krzywej wzorcowej.

3.3. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w obecności siarczanu dodecylu sodu (SDS-PAGE; ang. sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

W przypadku wszystkich próbek odmierzano taką objętość, aby każda z nich zawierała ekwiwalent równy 30 μg białka. Gdy objętość próbki była większa niż 20 μL , zagęszczano próbki w koncentratorze próżniowym z chłodzeniem (LABCONCO); zagęszczenie próbki następowało poprzez odparowanie rozpuszczalnika. Natomiast w sytuacji gdy wielkość próbki była zbyt mała, jej wolumen był uzupełniany dodatkową objętością buforu do lizy i ekstrakcji RIPA z inhibitorami proteaz. Do każdej próbki dodawano 19 μL buforu denaturującego 2 \times Laemmli Sample Buffer i 1 μL β -merkaptioetanolu (BioRad Laboratories). Następnie próbki wirowano. W celu przyspieszenia procesu denaturacji, próbki białek umieszczano w termoblokach z wytrząsaniem przy prędkości 250 rpm i w temperaturze 100°C przez okres 5 minut. Po inkubacji próbki zawierające zdenaturowane białka schładzano do temperatury pokojowej. Elektroforezę przeprowadzano w żelu poliakrylamidowym. Elektroforetyczny rozdział mieszaniny białek przeprowadzano przez 120-150 minut w aparacie Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) pod stałym napięciem równym 70 V dla żelu zagęszczającego i 110 V dla żelu rozdzielającego.

3.4. Elektrotransfer białek na błonę

Po zakończeniu procesu elektroforezy przeprowadzano transfer białek z żelu na błonę z fluoru poliwinylidenu/polifluorku winylidenu (PVDF Immobilon®-P; Sigma-Aldrich, Merck). Błonę aktywowano w roztworze metanolu przez okres 5 minut, a następnie przepłukiwano w wodzie destylowanej przez okres 3 minut w buforze przeznaczonym do elektrotransferu (GTB; ang. *Genie Transfer Buffer*). Białka, których rozdział przeprowadzano na 10% żelu, przenoszono w transferze półsuchym na błonę. Wcześniej namoczone bibuły Whatmana w buforze GTB wykorzystano do obłożenia żelu i błony. Elektrotransfer białek przeprowadzano przez okres 10-15 minut przy stałym natężeniu 1300 mA w aparacie Thermo Scientific Pierce

Power Blotter (ThermoFisher Scientific). Po zakończeniu transferu błony przepłukiwano pięciokrotnie po 3 minuty przy użyciu wytrząsarki kołyskowej w TBST (ang. *Tris-Buffered Saline with Tween 20*, bufor trisowy wzbogacony o Tween 20; Sigma-Aldrich, Merck).

3.5. Wykrywanie białek

Błonę PVDF inkubowano w 5% odtłuszczonego mleku sporządzonym w TBST przez 1 godzinę przy użyciu wytrząsarki kołyskowej w temperaturze pokojowej. Celem tej procedury było zablokowanie niespecyficznych miejsc wiązania przeciwciał z białkami. Po inkubacji, błonę przepłukiwano w buforze TBST pięciokrotnie po 3 minuty na wytrząsarce kołyskowej. Do każdej z błon dodawano 5 mL roztworu przeciwciał w określonym stężeniu (tab. 1), przygotowanych w buforze TBST z dodatkiem 1% BSA, a następnie przeprowadzano całościową inkubację błon w temperaturze 4°C. Po zakończeniu inkubacji, błony ponownie przepłukiwano 5 razy przez 3 minuty w TBST. Do każdej błony dodawano po 5 mL roztworu sprzężonych z peroksydazą chrzanową (HRP; ang. *horseradish peroxidase*) przeciwciał drugorzędowych (tab. 1), sporządzonych w buforze TBST. Następnie przystępowano do kolejnej inkubacji przez 1 godzinę przy użyciu wytrząsarki kołyskowej w temperaturze pokojowej. Po upływie 1 godziny błonę ciągle przepłukiwano, jednocześnie wytrząsając ją trzykrotnie po 3 minuty w buforze TBST i trzykrotnie po 3 minuty w roztworze soli fizjologicznej zbuforowanej za pośrednictwem Tris – *tris*(hydroksymetylo)aminometanu (TBS; ang. *Tris-Buffered Saline*; tzw. bufor trisowy).

Tabela 1. Kompleksowa charakterystyka pierwszo- i drugorzędowych przeciwciał wykorzystanych do analizy Western-blot
Table 1. Comprehensive characterization of primary and secondary antibodies used for Western-blot (W-B) analysis

Antygen <i>Antigen</i>	Przeciwciało pierwszorzędowe <i>Primary antibody</i>	Przeciwciało drugorzędowe <i>Secondary antibody</i>
Sox2 <i>Sex-determining region Y (SRY)-box 2</i>	poliklonalne królicze Anty-Sox2 1:500 Abcam	kozy anty-królicze sprzężone z HRP 1:2000 Vector Laboratories
Oct-3/4 <i>Octamer-binding transcription factor-3/4</i>	monoklonalne królicze anty-Oct-3/4 1:500 Abcam	kozy anty-królicze sprzężone z HRP 1:2000 Vector Laboratories
β-aktyna <i>β-actin</i>	monoklonalne mysie anty-β-aktyna 1:2000 Sigma-Aldrich	kozy anty-mysie sprzężone z HRP 1:3000 Bio-Rad Laboratories

3.6. Detekcja białek w żelu SDS-PAGE

Stosując metodę chemiluminescencyjną opartą o luminol (zestaw Clarity™ Western ECL Blotting Substrates, Bio-Rad Laboratories) uwidoczniano miejsca na żelu, w których zachodziła reakcja wiązania przeciwciał z antygenami. W pierwszej kolejności inicjowano proces inkubacji w odczynniku, w temperaturze pokojowej przez 90 sekund, przy całkowitej ciemności. Po zakończeniu inkubacji, błonę PVDF umieszczano w aparacie ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories). Wyniki generowano przy użyciu programu ImageLab 4.0 (Bio-Rad Laboratories).

3.7. Eliminacja przeciwciał („stripping”) w odniesieniu do referencyjnego białka β-aktyny

Proces ogołacania („stripping”) wykorzystuje się w celu usunięcia przeciwciał I-rzędowych i II-rzędowych skierowanych przeciwko badanym białkom. Polega on na odtrawieniu przeciw-

ciał związanych z błoną za pośrednictwem buforu charakteryzującego się niskim poziomem pH (pH=2). Białkiem referencyjnym w tym przypadku była β -aktyna. Detekcję β -aktyny przeprowadzano na tych samych błonach, na które uprzednio nakładano przeciwciała.

Inicjacja procesu „strippingu” miała miejsce poprzez trzykrotne przepłukiwanie błon PVDF na wytrząsarce kołyskowej w roztworze TBS po 10 minut. Po zakończeniu przepłukiwania przeprowadzono inkubację w buforze do strippingu przez 30 minut. Następnie przy użyciu wytrząsarki kołyskowej błony poddawano dwukrotnemu przepłukiwaniu po 10 minut, a dalszej kolejności jednokrotnemu przepłukiwaniu przez 10 minut w buforze TBST. W kolejnych etapach strippingu postępowano z błoną w sposób analogiczny jak po procesie elektroforezy, czyli przystępowano do zainicjowania reakcji blokowania aktywności przeciwciał w mleku, a w ostatnim etapie dodawano pierwszorzędowe przeciwciało, które skierowane było przeciwko β -aktynie.

3.8. Opracowanie wyników Western-blot-zależnej oceny proteomicznej komórek B-ESCs

Analizę Western-blot dla badanych białek powtórzono 2 razy. Zdjęcie każdej z błon oceniano przy użyciu programu ImageLab 4.0 (Bio-Rad Laboratories). Grubość prążków została zmierzona i znormalizowana względem pomiaru wykonanego na białku referencyjnym (β -aktynie).

4. Immunofluorescencyjna analiza komórek B-ESCs w celu potwierdzenia ich charakteru macierzystego oraz stopnia pluripotencji

Barwienie immunofluorescencyjne ukierunkowane na detekcję obecności biomarkerów pluripotencji komórek macierzystych, tj. homeotycznych czynników transkrypcyjnych Sox2 (ang. *sex-determining region Y (SRY)-box 2*) oraz Oct-3/4 (ang. *octamer-binding transcription factor-3/4*), wykonano wykorzystując przeciwciała pierwszorzędowe zastosowane w analizie Western-blot. Szczegóły dotyczące przeciwciał pierwszo- i drugorzędowych umieszczono w tabeli 2. Po usunięciu pożywki z dołków hodowlanych utrwalano komórki przy użyciu roztworu utrwalającego (4% roztwór paraformaldehydu – PFA w soli fizjologicznej zbuforowanej fosforanami – PBS) przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Następnie usunięto roztwór utrwalający i płukano komórki buforem TBS. Po zakończonej procedurze płukania permeabilizowano błony komórkowe 0,1% roztworem Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Merck) w TBS, w temperaturze pokojowej przez 30 sekund. Po tym czasie usunięto zawartość dołków hodowlanych i dodano do każdego z nich 200 μ L roztworu blokującego (szczegóły w tab. 2). Po 40-minutowej inkubacji z dołków usunięto roztwór blokujący i nałożono przeciwciała pierwszorzędowe. Inkubację prowadzono przez 24 godziny w temperaturze +4°C. Następnego dnia usunięto z dołków przeciwciała pierwszorzędowe i przeprowadzono procedurę płukania preparatów (5 razy po 3 minuty w TBST; płukanie przeprowadzono przy wykorzystaniu wytrząsarki kołyskowej) i kolejno nałożono przeciwciała drugorzędowe (tab. 2). Po godzinnej inkubacji przeprowadzanej w ciemności, w temperaturze pokojowej, ponownie płukano preparaty (3 razy po 3 minuty w TBS za pomocą wytrząsarki kołyskowej) i zamykano w żelu wysyconym mieszaniną fluorochromu 4',6-diamidyno-2-fenylindolu (DAPI) oraz odczynnika Vectashield, przeciwdziałającego przedwczesnemu wygasaniu sygnałów fluorescencyjnych tj. wydłużającego okres półtrwania wzbudzonych cząsteczek fluorochromu (DAPI-VECTASHIELD® HardSet™; Vector Laboratories). Tak przygotowane preparaty obrazowano za pomocą skanującego laserowego mikroskopu konfokalnego OLYMPUS FV1200 FLU-OVIEW (OLYMPUS, Tokio, Japonia) (parametry obrazowania w tab. 3).

Tabela 2. Kompleksowa charakterystyka pierwszo- i drugorzędowych przeciwciał wykorzystanych do analizy immunofluorescencyjnej

Table 2. Comprehensive characterization of primary and secondary antibodies used for immunofluorescence analysis

Antygen <i>Antigen</i>	Roztwór blokujący <i>Blocking solution</i>	Przeciwciało pierwszorządowe <i>Primary antibody</i>	Przeciwciało drugorzędowe <i>Secondary antibody</i>
Sox2 <i>Sex-determining region Y (SRY)-box 2</i>	5% normalna surowica kozia Sigma-Aldrich	poliklonalne królicze Anty-Sox2 1:50 Abcam	kozy anty-królicze znakowane AlexaFluor488 1:500 ThermoFisher SCIENTIFIC
Oct-3/4 <i>Octamer-binding transcription factor-3/4</i>	5% normalna surowica kozia Sigma-Aldrich	monoklonalne królicze anty-Oct-3/4 1:100 Abcam	kozy anty-królicze znakowane AlexaFluor488 1:500 ThermoFisher SCIENTIFIC

Tabela 3. Parametry obrazowania struktur komórkowych w mikroskopie konfokalnym OLYMPUS FV1200 FLUOVIEW

Table 3. Parameters of imaging the cell structures in confocal microscope OLYMPUS FV1200 FLUOVIEW

Fluorochrom <i>Fluorochrome</i>	Laser (DIODA) <i>Laser (DIODE)</i>	Długość fali promieniowania absorpcyjnego/wzbudzającego ($\lambda_{ab/ex}$); Długość fali promieniowania emitowanego (λ_{em}) <i>Wavelength of absorbed/exciting radiation ($\lambda_{ab/ex}$); Wavelength of emitted radiation (λ_{em})</i>
Alexa Fluor 488	473 nm	$\lambda_{ab/ex} = 473$ nm; $\lambda_{em} = 520$ nm
DAPI	405 nm	$\lambda_{ab/ex} = 405$ nm; $\lambda_{em} = 461$ nm

Wyniki

Stwierdzono, że po 96 godzinach hodowli z wykorzystaniem polistyrenowych butelek hodowlanych SPL Life Sciences (ryc. 1A) oraz NuncTMEasYFlaskTM (z podłożem typu Δ ; ryc. 1B), pomimo wcześniej zaobserwowanej progresji w procesach adhezji i proliferacyjnego wzrostu *in vitro*, komórki BCs zaczęły masowo odklejać się od podłoża. Natomiast po 15 pasażach hodowli namnażającej ESCs z wykorzystaniem szklanych mikro płytek 8-komorowych Ibidi z podłożem powlekanym syntetycznym substratem polimerowym – poli-L-lizyną (μ -Slide 8 Well high Poly-L-Lysine; ryc. 1C) oraz plastikowych szalek hodowlanych powlekanych kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL CoatTM Collagen Type I Coated Dishes; Rycina 1D) wyizolowano białko całkowite, w kierunku określenia profilu proteomicznego wybranych czynników transkrypcyjnych warunkujących pluripotencję wyprowadzonych linii komórek B-ESC, poprzez przeprowadzenie analizy Western-blot (W-B) oraz analizę immunofluorescencyjną białek markerowych komórek pluripotentnych: Oct3/4 (ang. *octamer-binding transcription factor 3/4*) oraz Sox2 (ang. *sex-determining region Y (SRY)-box 2*) (ryc. 2 i 3).

Wpływ podłoża hodowlanego na aktywność proliferacyjną blastodermalno-pochodnych komórek ESCs kury domowej

Test BrdU stanowi procedurę, która w sposób ilościowy obrazuje syntezę DNA, a więc proliferację komórek. 5-bromo-2'-deoksyurydyna jest syntetycznym analogiem nukleozydu – tymidyny, który wbudowywany jest do DNA w dzielącej się komórce w trakcie fazy S cyklu podziałowego komórki. Inkorporacja cząsteczek BrdU i ich specyficzne wiązanie (addycja) z DNA jądrowym następuje w wyniku wielokrotnego zajęcia reakcji substytucji – przez atomy bromu, pochodzące z cząsteczek BrdU – grup metylowych przyłączonych do atomów węgla

znajdujących się w pozycji 5 (5-C) tymidyny (Kolb i in., 1999). Detekcja wbudowanych cząsteczek BrdU jest możliwa wskutek użycia specyficznego przeciwciała sprzężonego z enzymem peroksydazą (tj. koniugatu anty-BrdU-POD) i jego reakcji z dodawanym substratem. Reakcja ta pozwala na kolorymetryczną analizę zdolności proliferacyjnych badanych komórek (Liboska i in., 2012).

Wyniki testu proliferacji zostały opracowane na podstawie przeprowadzonych pomiarów absorbancji mierzonych w 10. i 15. minucie od dodania roztworu substratowego (Substrate solution) i przedstawione w tabeli 4 oraz na wykresie 1. Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między komórkami hodowanymi w butelkach hodowlanych SPL Life Sciences Cell Culture Flasks z substratem polistyrenowym a komórkami rosnącymi w butelkach hodowlanych Nunc™EasYFlask™ Cell Culture Flasks z substratem polistyrenowym o powierzchni dennej typu Δ, zwiększającej adherentność i siły przyciągania elektrostatycznego komórek do podłoża. Podobnie, nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między komórkami rosnącymi w wysokościennej mikropłytkach 8-komorowych Ibidi z dnem szklanym powlekanym syntetycznym substratem polimerowym – poli-L-lizyną i komórkami rosnącymi w polistyrenowych szalkach hodowlanych o średnicy 60 mm, z podłożem powlekanym kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes).

Przeprowadzone analizy wykazały istotnie statystycznie wyższy poziom proliferacji komórek hodowanych z wykorzystaniem mikropłytek 8-komorowych Ibidi i szalek hodowlanych powlekanym kolagenem typu I w stosunku do komórek hodowanych zarówno w butelkach hodowlanych SPL Life Sciences Cell Culture Flasks z substratem polistyrenowym jak i w butelkach hodowlanych Nunc™EasYFlask™ Cell Culture Flasks z substratem polistyrenowym o powierzchni dennej typu Δ.

Tabela 4. Różnica będąca wynikiem matematycznego/arytmetycznego działania odejmowania średniej absorbancji przy długości fali $\lambda_{em} = 492$ nm od średniej wartości absorbancji przy długości fali $\lambda_{ab/ex} = 370$ nm oraz analiza poziomu różnic statystycznych przy zastosowaniu testu *t*-Studenta dla średnich wartości między komórkami B-ESCs rosnącymi w różnych naczyniach hodowlanych w 10. i 15. minucie od dodania roztworu substratowego (*Substrate solution*)

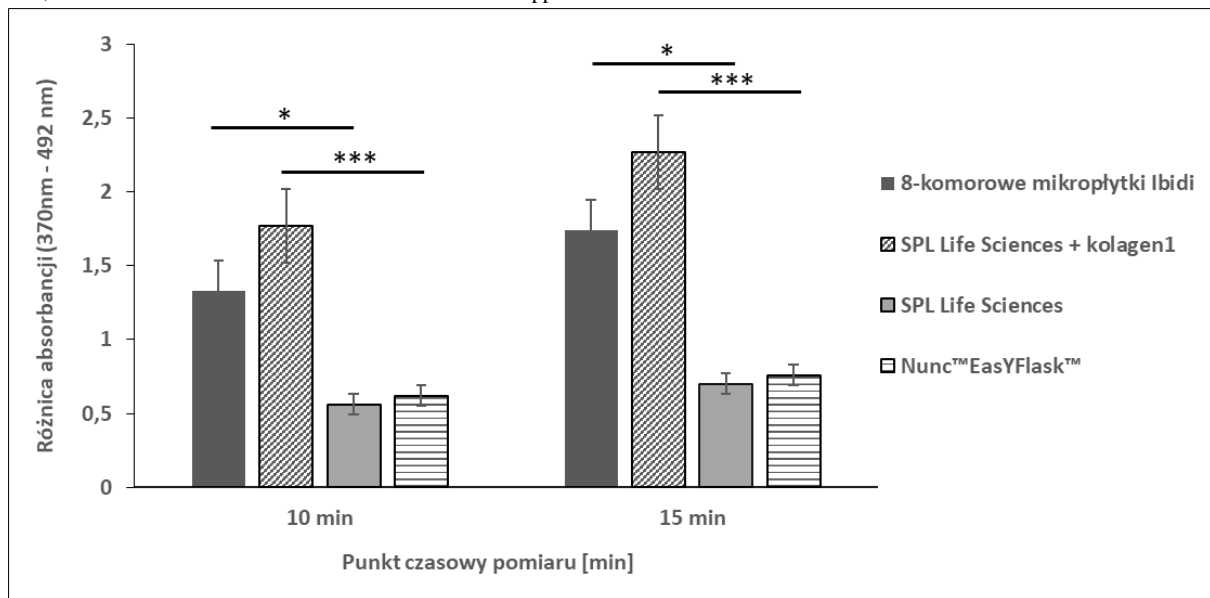
Table 4. The difference being the result of mathematical (arithmetic) operation of subtracting the mean value of absorbance at an emission wavelength of $\lambda_{em} = 492$ nm from the mean value of absorbance at an absorption/excitation wavelength of $\lambda_{ab/ex} = 370$ nm and the *t*-Student test-mediated analysis of the levels of statistical differences pinpointed for mean values between experimental groups of B-ESCs proliferating in various cell culture vessels at the 10- and 15-minute timepoints following addition of Substrate solution

Rodzaj naczyń/substratów użytych do hodowli <i>in vitro</i> komórek B-ESCs <i>The type of vessels/substrata used for in vitro culture of B-ESCs</i>	Średnia różnica absorbancji [nm] w 10. minucie <i>Average absorbance difference [nm] at 10 minutes</i>	Test <i>t</i> -Studenta <i>t-Student test</i>	Średnia różnica absorbancji [nm] w 15. minucie <i>Average absorbance difference [nm] at 15 minutes</i>	Test <i>t</i> -Studenta <i>t-Student test</i>
Wysokościenne szklane 8-komorowe mikropłytki Ibidi (powlekanie substratem polimerowym poli-L-lizyną) <i>μ-Slides 8 Well high Poly-L-Lysine: 1.5 polymer coverslip</i>	1,33 ± 0,55	0,11	1,74 ± 0,65	0,09
Polistyrenowe szalki hodowlane SPL Life Sciences (powlekanie kolagenem typu I) <i>SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes</i>	1,77 ± 0,54		2,27 ± 0,60	

<p>Plastikowe butelki hodowlane SPL Life Sciences (z substratem polistyrenowym) <i>SPL Life Sciences Cell Culture Flasks</i></p>	0,56 ± 0,30		0,70 ± 0,35	
<p>Plastikowe butelki hodowlane Nunc™EasYFlask™ (z substratem polistyrenowym o powierzchni dennej typu Δ) <i>Nunc™EasYFlask™ Cell Culture Flasks</i></p>	0,62 ± 0,37	0,69	0,76 ± 0,44	0,72

Wykres 1. Różnica absorbancji dla komórek B-ESCs rosnących w różnych naczyniach hodowlanych po 10 i 15 minutach od dodania roztworu substratowego (*Substrate solution*)

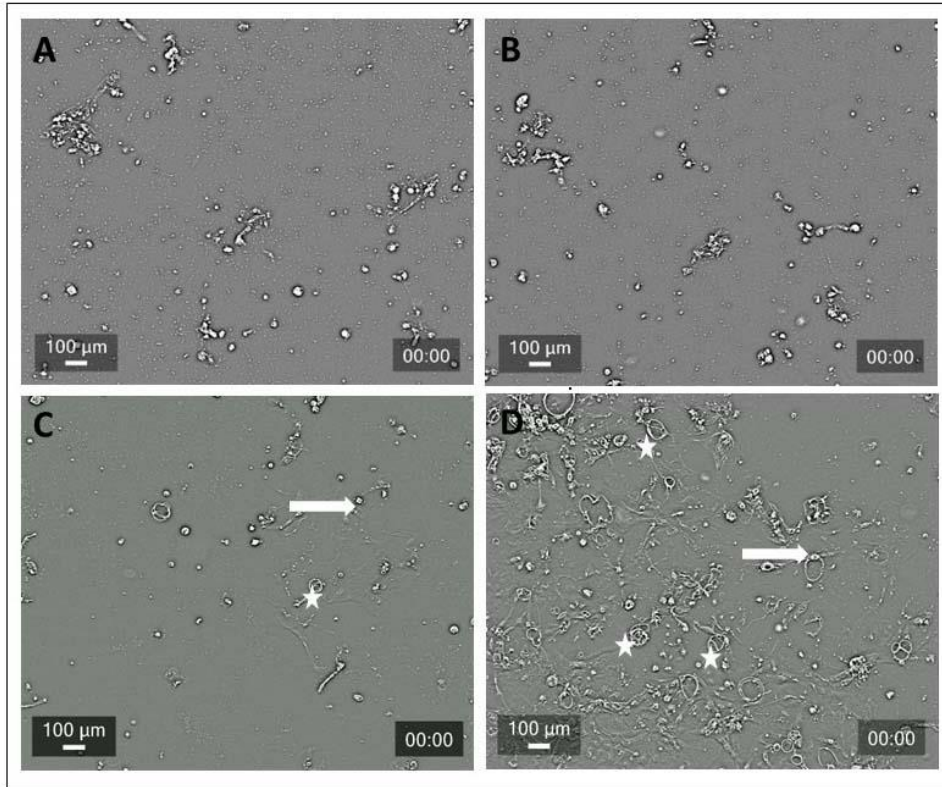
Diagram 1. The chart depicting the difference in the absorbance noticed for B-ESCs expanded in various types of cell culture vessels, which has been estimated 10 and 15 minutes after supplementation with Substrate solution



Wartość p dla testu t -Studenta między poszczególnymi grupami: * $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Rycina 1. Opracowanie modelu *in vitro* wyprowadzania blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (ESCs) kury domowej na potrzeby określenia warunków fizyko-chemicznych i biologicznych ich izolacji, adhezji oraz proliferacji *ex ovo*

Figure 1. Elaborating the model of *in vitro* establishment of chicken blastoderm-derived embryonic stem cells (B-ESCs) for the purposes of determining the physico-chemical and biological conditions of their isolation, *ex ovo* adhesion and proliferation

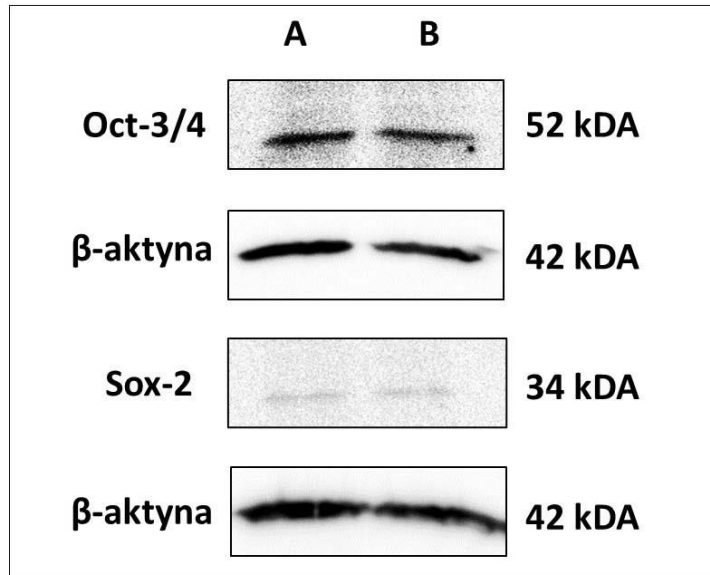


Analiza proliferacyjnego wzrostu oraz ocena cytologiczna blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) kury domowej w mikroskopie skanującym CELLCYTE X (CELLLINK Life Science) po 7 dniach hodowli *in vitro* z wykorzystaniem: **A**) butelek hodowlanych SPL Life Sciences Cell Culture Flasks (o pojemności 25 cm²) z substratem polistyrenowym; **B**) butelek hodowlanych Nunc™EasYFlask™ Cell Culture Flasks (o pojemności 25 cm²) z substratem polistyrenowym o powierzchni dennej typu Δ; **C**) szklanych mikro-płytek 8-komorowych Ibidi z podłożem powlekanym syntetycznym substratem polimerowym – poli-L-lizyną (µ-Slide 8 Well high Poly-L-Lysine: 1.5 polymer coverslip) oraz **D**) polistyrenowych szalek hodowlanych o średnicy 60 mm, z podłożem powlekanym kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes). W adherentnych hodowlach prowadzonych z wykorzystaniem polistyrenowych szalek hodowlanych o średnicy 60 mm, z podłożem powlekanym kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes) (**D**) zaobserwowano komórki B-ESCs proliferujące w monowarstwie. Zarówno w hodowlach prowadzonych z wykorzystaniem szklanych mikro-płytek 8-komorowych Ibidi z podłożem powlekanym poli-L-lizyną (µ-Slide 8 Well high Poly-L-Lysine: 1.5 polymer coverslip) (**C**), jak i z wykorzystaniem szalek hodowlanych typu SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes (**D**) komórki B-ESCs posiadają charakterystyczne duże jądra (oznaczone gwiazdkami); w ultrastrukturalnym obrazie nukleoplazmy jąder komórkowych można zidentyfikować również jąderka – najczęściej zlokalizowane blisko wewnętrznej warstwy otoczki jądrowej (oznaczone strzałkami).

Aby rozpoznać pluripotentny charakter komórek B-ESCs, w wyizolowanym białku całkowitym, otrzymanym na skutek ultrasonicznej dezintegracji (lizy) komórek, pochodzących z hodowli podtrzymujących linii/szczepów komórkowych poddanych minimum 15 pasażom (podwojeniom populacji), wykazano ekspresję wybranych, białkowych markerów pluripotencji (Oct-3/4, Sox-2) (ryc. 2). Stwierdzono obecność obydwu homeotycznych czynników transkrypcyjnych, co dowodzi charakteru pluripotentnego komórek B-ESCs.

Rycina 2. Opracowanie modelu *in vitro* wyprowadzania blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) kury domowej na potrzeby określenia profilu proteomicznego wybranych czynników transkrypcyjnych (Oct-3/4; Sox-2) determinujących stabilne utrzymanie pluripotencji *ex ovo* przez komórki ESCs

Figure 2. Elaborating the model of *in vitro* establishment of chicken blastoderm-derived embryonic stem cells (B-ESCs) for the purposes of recognizing the proteomic profile of selected transcription factors (Oct-3/4; Sox-2) that determine a sustainable maintenance of the *ex-ovo* pluripotency by B-ESCs

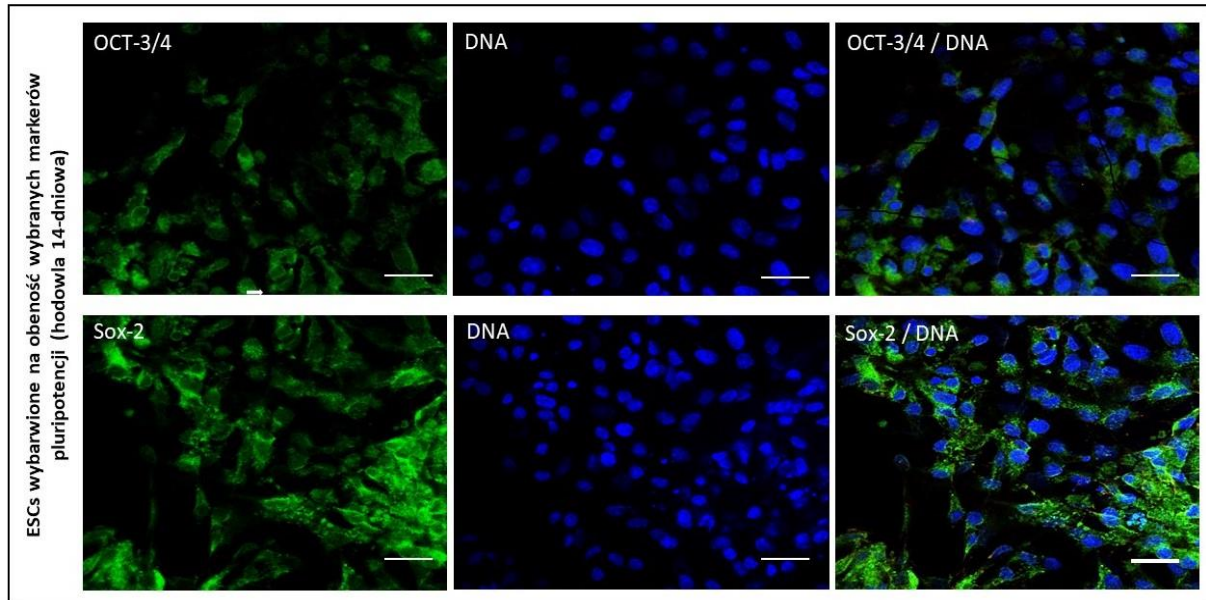


Analiza półilościowa Western-blot (W-B) biomarkerów pluripotencji Oct-3/4 i Sox-2 na poziomie białka całkowitego, wyizolowanego z blastodermalno-pochodnych komórek ESCs w ok. 15. pasażu ich hodowli *in vitro* z wykorzystaniem szklanych mikropłytek 8-komorowych Ibidi z podłożem powlekanym poli-L-lizyną (μ -Slide 8 Well high Poly-L-Lysine: 1.5 polymer coverslip) (A) oraz z wykorzystaniem polistyrenowych szalek hodowlanych z podłożem powlekanym kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes) (B).

W celu potwierdzenia wyników uzyskanych w oparciu o analizę Western-blot, po zakończeniu hodowli przeprowadzono immunofluorescencyjną identyfikację wewnątrzkomórkowej lokalizacji wybranych biomarkerów pluripotencji z grupy homeotycznych czynników transkrypcyjnych Oct-3/4 i Sox-2. W oparciu o uzyskane wyniki można stwierdzić, że w komórkach B-ESCs, po zakończeniu ich hodowli namnażającej, są obecne białka markerowe pluripotencji, co jest dowodem wprost wskazującym na istnienie molekularnych cech fenotypowych związanych z pluripotentnym charakterem komórek macierzystych (ryc. 3).

Rycina 3. Immunofluorescencyjna lokalizacja wybranych białek markerowych pluripotencji (Oct-3/4 i Sox-2) w blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórkach macierzystych (B-ESCs), wywodzących ze stabilnych mitotycznie linii/szczepów poddanych minimum 15 pasażom w warunkach hodowli namnażającej *ex ovo*

Figure 3. Immunofluorescent localization of selected pluripotency-related protein biomarkers (Oct-3/4 and Sox-2) in the *ex-ovo*-expanded blastoderm-derived embryonic stem cells (B-ESCs) originating from mitotically stable lines/strains subjected to a minimum number of passages equal to 15



Mikrofotografie przedstawiają komórki B-ESCs rosnące w postaci monowarstwy – obecność zielonego sygnału pochodzącego od barwnika fluorescencyjnego AlexaFluor 488 oznacza obecność białka markerowego Oct-3/4 (górny panel) i Sox-2 (dolny panel) w tych komórkach. Na wszystkich zdjęciach niebieski sygnał pochodzi od fluorochromu DAPI, który znakuje DNA jąder komórkowych. Skala: 100 μ m.

Omówienie wyników

W ramach przeprowadzonych prac badawczych podjęto efektywne działania mające na celu opracowanie nowej procedury badawczej ukierunkowanej na stworzenie modelu *in vitro* wyprowadzania blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) kury domowej na potrzeby:

- 1) określenia warunków fizyko-chemicznych i biologicznych: izolacji, adhezji oraz proliferacji *ex ovo* komórek B-ESCs kury domowej, przy wykorzystaniu nowoczesnych technik biotechnologii reprodukcyjnej oraz embriologii eksperymentalnej i stosowanej – w ramach technologii wspomaganego rozrodu zwierząt, inżynierii zarodkowej oraz inżynierii komórkowej;
- 2) określenia profilu proteomicznego wybranych czynników transkrypcyjnych determinujących stabilne utrzymanie pluripotencji przez komórki B-ESCs kury domowej (ryc. 2), przy wykorzystaniu nowoczesnych technik biotechnologii i biologii molekularnej – w ramach technologii wspomaganego rozrodu zwierząt, inżynierii zarodkowej oraz inżynierii komórkowej.

Zasadniczym celem tej pracy było opracowanie stabilnej i uproszczonej metody hodowli komórek zarodkowych kury domowej, wykazujących cechy komórek macierzystych ESCs (tj. komórek pluripotentnych) w warunkach *ex ovo*. Pluripotentne komórki macierzyste ptaków mają zdolność do generowania zarówno linii zarodkowej, jak i chimerowej linii somatycznej (Bradley i in., 1984). Jednakże, jak do tej pory możliwe było uzyskiwanie komórek zarodkowych ptaków wykazujących cechy pluripotencji jedynie w warunkach hodowli krótkoterminowych (Petitte i in., 2004; Laval i in., 2009). Warto zaznaczyć, że w ostatnich latach

nastąpił niezwykle postęp w hodowli pluripotencyjnych komórek macierzystych ptaków. Pozwoliło to na uzyskanie linii komórkowej 9N2-5 (Pain i in., 1996; Acloque i in., 2001). Co więcej, strategie namnażania *in vitro* ptasich komórek ESCs były stopniowo udoskonalane poprzez: 1) wykorzystanie pożywek hodowlanych wzbogaconych o polipeptydowe czynniki wzrostowe takie jak: zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów człowieka (hbFGF), insulino-podobny czynnik wzrostowy typu I (IGF1), czynnik wzrostu komórek macierzystych myszy (mSCF), ludzka interleukina-6 (hIL-6), rozpuszczalny fragment receptora interleukiny-6 człowieka hIL6-sR (ang. *Interleukin-6 Receptor Soluble Fragment*) i ludzki czynnik hamujący leukemię (hLIF) (Park i Han, 2000; Acloque i in., 2001; Choi i in., 2010; Zhang i in., 2018) lub poprzez: 2) zastosowanie systemów współhodowli z użyciem adherentnych monowarstw odżywczych (ang. *feeder monolayers*) utworzonych z immortalizowanych / unieśmiertelnionych subpopulacji mysich fibroblastów płodowych STO, często podatnych na inaktywację mitotyczną za pośrednictwem cytostatyków/antymitogenów (np. mitomycyny C; MMC) (Wang i in., 2006; Zhang i in., 2018). Warto podkreślić, że linie komórek fibroblastycznych STO (S: SIM-pochodnych; T: 6-tioguanino-opornych; O: ouabaino-opornych), służące do podtrzymywania aktywności proliferacyjnej komórek ESCs, wywodzą się z płodów zimbredowanego szczepu myszy Sandos (SIM; Sandos inbred mice) z mutacją genu kodującego enzym fosforybozylotransferazę hipoksantynowo-guaninową (HPRT), który katalizuje konwersję guaniny (należącej do grupy puryn) oraz hipoksantyny do nukleotydów (Saitoh i in., 2012). Dlatego też immortalizowane linie komórek fibroblastycznych STO – w następstwie fenotypowego braku aktywności tego enzymu – wykazują wysoką oporność na działanie takich cytostatyków jak: główny metabolit/analog tiopuryn o nazwie 6-tioguanina; glikozyd – ouabaina, czyli strofantyna-G ($\text{Na}^+\text{-K}^+$ -zależny inhibitor ATPaz). Linie fibroblastów STO charakteryzuje jednocześnie wysoka wrażliwość na działanie enzymu HPRT oraz triady HAT, czyli hipoksantyny (zasada azotowa/oksypuryna będąca składnikiem nukleozydu purynowego – inozyny), aminopteryny – kwasu 4-aminofoliowego (antymetabolit/antagonista kwasu foliowego, jednego z najważniejszych koenzymów w syntezie zasad purynowych i pirymidynowych oraz nukleotydów wchodzących w skład kwasów nukleinowych: RNA i DNA) i tymidyny (nukleozyd pirymidynowy) (Cong i in., 2014). Opracowano także systemy hodowli ptasich komórek ESCs w pożywce uwarunkowanej aktywnością sekrecyjną komórek wątroby szczura bawolego (BRL-CM; ang. *buffalo rat liver-conditioned medium*) i na monowarstwie odżywczej uformowanej z mysich fibroblastów płodowych STO (van de Lavoie i Mather-Love, 2006). Obecnie stosuje się specjalnie dedykowane cytokiny i podłoża hodowlane, aby zachować kurze komórki ESCs w stanie nieróżnicowanym. Czynnik hamujący leukemię (LIF), będący przedstawicielem rodziny interleukin-6 (IL-6), jest uznawany za wysoko skuteczny czynnik o właściwościach cytobiochemicznych warunkujących utrzymanie komórek w stanie cytofizjologicznego niezróżnicowania (Nichols i in., 1990; Horiuchi i in., 2004; Zhang i in., 2018). Udowodniono również, że zastosowanie egzogenego zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów (bFGF) może zapobiegać różnicowaniu się zarodkowych komórek macierzystych człowieka (Wang i in., 2005). Z kolei suplementacja za pośrednictwem polipeptydowego czynnika wzrostu komórek macierzystych (SCF) sprzyja zachowaniu molekularnych cech pluripotencji komórek pochodzenia embrionalnego u kury domowej (Park i Han, 2000). Mimo że system współhodowli bazujący na monowarstwie odżywczej utworzonej z mysich fibroblastów płodowych STO oraz pożywce BRL-CM pozwala na utrzymanie linii kurzych komórek ESCs w stanie nieróżnicowanym przez ponad 20 pasaży, subpopulacje komórkowe są pochodzenia heterologicznego (ksenogenicznego), uzyskiwanie medium hodowlanego jest skomplikowaną wieloetapową procedurą, a jego skład jakościowy i ilościowy oraz strukturalny rozkład i koncentracje poszczególnych polipeptydowych czynników wzrostowych obecnych w medium uwarunkowanych funkcjami cytosekrecyjnymi i parakrynnymi nie są dokładnie zdefiniowane (van de Lavoie i Mather-Love, 2006). W związku z tym istnia-

ło zapotrzebowanie na opracowanie uproszczonych, a jednocześnie optymalnych warunków hodowli w celu utrzymania pluripotencji kurzych komórek ESCs podczas długoterminowej hodowli namnażającej.

Wyniki naszych badań sugerują, że opracowany system hodowli wykorzystujący naczynia hodowlane: szklane mikropłytki 8-komorowe Ibidi z podłożem powlekanym poli-L-lizyną oraz polistyrenowe szalki hodowlane z podłożem powlekanym kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes), a także wykorzystujący medium hodowlane wzbogacone o SCF oraz B-27™ Plus (Wartalski i in., 2021), jest w stanie utrzymać komórki zarodkowe o cechach znamiennej dla komórek macierzystych przez ponad 15 pasażów *in vitro*. Okrągły i charakterystyczny dla komórek ESCs kształt skupisk komórkowych został potwierdzony poprzez obserwacje morfologiczne. Skupiska komórkowe mają kształt sferyczny, ale nie są tak okrągłe i zwarte jak komórki zarodkowe człowieka, myszy lub świni. Nie posiadają również tak wyraźnych granic jak zarodkowe komórki macierzyste myszy (mESCs) i zarodkowe komórki macierzyste człowieka (hESCs). Embrionalne komórki macierzyste kury domowej są komórkami o silnie zarysowanym kulistym kształcie morfologicznym, co determinuje brak zdolności ich ścisłego przylegania do siebie. Ponadto charakteryzują się one obecnością sferycznego jądra komórkowego oraz niskim stosunkiem cytoplazmy do jądra.

Chociaż niektóre hodowane komórki ESCs mogą wykazywać wygląd morfologiczny i profil epitopowy o cechach typowych dla embrionalnych komórek macierzystych, najbardziej rygorystycznym testem potwierdzającym potencjał rozwojowy jest sprawdzenie obecności biomarkerów właściwych dla pluripotentnych komórek ESCs. Co ciekawe, komórki B-ESCs kury domowej, hodowane przez minimum 15 pasażów w nowo opracowanym przez nasz zespół naukowo-badawczy systemie *ex ovo*, odznaczały się ekspresją wybranych markerów charakterystycznych dla pluripotentnych komórek macierzystych (Oct-3/4 i Sox2) na poziomie proteomicznym.

W rezultacie realizacji naszych badań stabilne mitotycznie linie komórek zarodkowych o morfologii oraz profilach immunofenotypowych (epitopowych) specyficznych dla komórek macierzystych, które zostały wyprowadzone z blastodermi embriodysków wyizolowanych z zapłodnionych jaj kurzych w stadium X, były zdolne do utrzymania wysokiej aktywności proliferacyjnej w warunkach długotrwałej hodowli *in vitro*, jednocześnie zachowując cechy typowe dla charakteru macierzystego (ang. *stemness*), przy wsparciu odpowiedniego podłoża naczyń hodowlanych oraz podstawowego medium hodowlanego wzbogaconego jedynie trzema suplementami o właściwościach mitogennych oraz energetycznotroficznych (FBS, B-27™ Plus, SCF). Zastosowany alternatywny i stosunkowo prosty model *ex ovo* pozwolił na utrzymanie cech znamiennej dla pluripotentnych komórek zarodkowych ptaków w warunkach długoterminowej hodowli *in vitro*. Te wysoce zachęcające wyniki będą stanowić punkt wyjścia do dalszego doskonalenia i postępu w zastosowaniu technologii ptasich komórek B-ESCs.

Wnioski końcowe

Na podstawie oceny morfologicznej, ilościowej analizy Western-blot oraz analizy immunofluorescencyjnej stwierdzono, że wyizolowane frakcje komórek blastodermalnych, z których wyprowadzono stabilne linie zarodkowych komórek macierzystych (ryciny 1C i 1D), wykazują cechy fenotypowe dla niezróżnicowanych komórek ESCs, w tym obecność czynników transkrypcyjnych Oct3/4 oraz Sox2, determinujących charakter pluripotentny (rycina 2). W związku z powyższym, do dalszych eksperymentów ukierunkowanych na stworzenie modeli *in vitro* wyprowadzania stabilnych mitotycznie linii komórek ESCs (ryciny 1C i 1D), pochodzących z blastodermi dyskoblasteri kury domowej, z powodzeniem mogą być wykorzy-

stywane zarówno szklane mikropłytki 8-komorowe Ibidi z podłożem powlekanym syntetycznym substratem polimerowym – poli-*L*-lizyną (μ -Slide 8 Well high Poly-*L*-Lysine), jak i polistyrenowe szalki hodowlane z dnem powlekanym kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes).

Podsumowanie: Możliwości praktycznego wykorzystania uzyskanych rezultatów badań. Przyszłe cele i wyzwania oraz perspektywiczne kierunki wynikające z szerokiego potencjału aplikacyjnego podjętych prac badawczych

Najważniejszym autem i najmocniejszą stroną przeprowadzonych badań ukierunkowanych na opracowanie strategii wyprowadzania stabilnych linii zarodkowych komórek macierzystych (pierwotnych komórek zarodkowych) z wyizolowanych komórek blastodermalnych kury domowej jest ich pionierski i innowacyjny charakter, który stanowi solidną podstawę programową dla realizacji i powodzenia założeń dalszych, bardziej zaawansowanych prac badawczo-rozwojowych z zakresu: 1) biotechnologii rolniczej i reprodukcyjnej oraz 2) badań interdyscyplinarnych na styku biomedycyny, transgeniki, biologii i biotechnologii molekularnej, a także 3) biotechnologicznie i embriologicznie wspomaganą ochrony *ex situ* i restytucji ginących lub wymarłych gatunków i ras ptaków hodowlanych i wolnożyjących (Blackburn, 2006; Wang i in., 2006; Laval i in., 2009; Woodcock i in., 2019; Soglia i in., 2021; Rieblinger i in., 2021; Sun i in., 2022; Samiec i Trzcińska, 2022).

Piśmiennictwo

- Acloque H., Risson V., Birot A.M., Kunita R., Pain B., Samarut J. (2001). Identification of a new gene family specifically expressed in chicken embryonic stem cells and early embryo. *Mech. Dev.*, 103 (1-2): 79–91.
- Bai C., Wang D., Li C., Jin D., Li C., Guan W., Ma Y. (2011). Establishment and biological characteristics of a Jingning chicken embryonic fibroblast bank. *Eur. J. Histochem.*, 55 (1): e4.
- Bai C., Li X., Hou L., Zhang M., Guan W., Ma Y. (2013). Biological characterization of chicken mesenchymal stem/progenitor cells from umbilical cord Wharton's jelly. *Mol. Cell Biochem.*, 376 (1-2): 95–102.
- Blackburn H.D. (2006). The National Animal Germplasm Program: challenges and opportunities for poultry genetic resources. *Poult. Sci.*, 85 (2): 210–215.
- Bradley A., Evans M., Kaufman M.H., Robertson E. (1984). Formation of germ-line chimeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature*, 309: 255–256.
- Carsience R.S., Clark M.E., Verrinder Gibbins A.M., Etches R.J. (1993). Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development*, 117 (2): 669–675.
- Choi J.W., Kim S., Kim T.M., Kim Y.M., Seo H.W., Park T.S., Jeong J.W., Song G., Han J.Y. (2010). Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS One*, 5 (9): e12968.
- Cong S., Cao G., Liu D. (2014). Effects of different feeder layers on culture of bovine embryonic stem cell-like cells *in vitro*. *Cytotechnology* 66: 995–1005.
- Couteaudier M., Trapp-Fragnet L., Auger N., Courvoisier K., Pain B., Denesvre C., Vautherot J.F. (2015). Derivation of keratinocytes from chicken embryonic stem cells: establishment and characterization of differentiated proliferative cell populations. *Stem Cell Res.*, 14 (2): 224–237.

- Guan W., He X., Li L., Liang H., Zhao Q., Pu Y., Ma Y.H. (2010). Establishment and biological characterization of fibroblast cell line from the Langshan chicken. *Cell Prolif.*, 43 (2): 157–163.
- Horiuchi H., Tategaki A., Yamashita Y., Hisamatsu H., Ogawa M., Noguchi T., Aosasa M., Kawashima T., Akita S., Nishimichi N., Mitsui N., Furusawa S., Matsuda H. (2004). Chicken leukemia inhibitory factor maintains chicken embryonic stem cells in the undifferentiated state. *J. Biol. Chem.*, 279 (23): 24514–24520.
- Hu T., Taylor L., Sherman A., Keambou Tiambo C., Kemp S.J., Whitelaw B., Hawken R.J., Djikeng A., McGrew M.J. (2022). A low-tech, cost-effective and efficient method for safeguarding genetic diversity by direct cryopreservation of poultry embryonic reproductive cells. *eLife*, 25 (11): e74036.
- Kolb B., Pedersen B., Ballermann M., Gibb R., Whishaw I.Q. (1999). Embryonic and postnatal injections of bromodeoxyuridine produce age-dependent morphological and behavioral abnormalities. *J. Neurosci.*, 19 (6): 2337–2346.
- Lavial F., Acloque H., Bachelard E., Nieto M.A., Samarut J., Pain B. (2009). Ectopic expression of *Cvh* (chicken vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate. *Dev. Biol.*, 330 (1): 73–82.
- van de Lavoie M.C., Mather-Love C. (2006). Avian embryonic stem cells. *Methods Enzymol.*, 418: 38–64.
- Liboska R., Ligasová A., Strunin D., Rosenberg I., Koberna K. (2012). Most anti-BrdU antibodies react with 2'-deoxy-5-ethynyluridine – the method for the effective suppression of this cross-reactivity. *PLoS One*, 7(12): e51679.
- Na R.S., Bai C.Y., Jin D.P., Su X.H., Feng B.G., Guan W.J., Ma Y.H. (2010). Establishment and biological characteristics of Qingyuan partridge chicken fibroblast line. *Poult. Sci.*, 89 (6): 1207–1216.
- Nandi S., Whyte J., Taylor L., Sherman A., Nair V., Kaiser P., McGrew M.J. (2016). Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. *Poult. Sci.*, 95 (8): 1905–1911.
- Nichols J., Evans E.P., Smith A.G. (1990). Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity. *Development*, 110 (4): 1341–1348.
- Pain B., Clark M. E., Shen M. (1996). Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development*, 122 (8): 2339–2348.
- Park T.S., Han J.Y. (2000). Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol. Reprod. Dev.*, 56 (4): 475–482.
- Petitte J.N., Clark M.E., Liu G., Verrinder Gibbins A.M., Etches R.J. (1990). Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development*, 108 (1): 185–189.
- Petitte N., Liu G., Yang Z. (2004). Avian pluripotent stem cells. *Mech. Dev.*, 21 (9): 1159–1168.
- Rieblinger B., Sid H., Duda D., Bozoglu T., Klinger R., Schlickerrieder A., Lengyel K., Flisikowski K., Flisikowska T., Simm N., Grodziecki A., Perleberg C., Bähr A., Carrier L., Kurome M., Zakhartchenko V., Kessler B., Wolf E., Kettler L., Luksch H., Hagag I.T., Wise D., Kaufman J., Kaufer .BB., Kupatt C., Schnieke A., Schusser B. (2021). Cas9-expressing chickens and pigs as resources for genome editing in livestock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 118 (10): e2022562118.
- Saitoh I., Sato M., Iwase Y., Inada E., Nomura T., Akasaka E., Yamasaki Y., Noguchi H. (2012). Generation of mouse STO feeder cell lines that confer resistance to several types of selective drugs. *Cell Med.*, 3 (1-3): 97–102.

- Samiec M., Trzcńska M. (2022). Rola kriobanków linii komórkowych w programach zachowania różnorodności biologicznej ssaków i ptaków hodowlanych. (The importance of cryobanks of cell lines for the programs aimed to maintain the biological diversity of farm mammalian and avian species). *Rocz. Nauk. Zoot.*, 49 (2): 91–102.
- Soglia D., Sartore S., Lasagna E., Castellini C., Cendron F., Perini F., Cassandro M., Marzoni M., Iaffaldano N., Buccioni A., Dabbou S., Castillo A., Maione S., Bianchi C., Profiti M., Sacchi P., Cerolini S., Schiavone A. (2021). Genetic diversity of 17 autochthonous Italian chicken breeds and their extinction risk status. *Front. Genet.*, 14 (12): 715656.
- Sun Y., Li Y., Zong Y., Mehaisen G.M.K., Chen J. (2022). Poultry genetic heritage cryopreservation and reconstruction: advancement and future challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 13 (1): 115.
- Svoradová A., Kuželová L., Vašíček J., Olexíková L., Chrenek P. (2018). Cryopreservation of chicken blastodermal cells and their quality assessment by flow cytometry and transmission electron microscopy. *Biotechnol. Prog.*, 34 (3): 778–783.
- Vanhoutteghem A., Londero T., Ghinea N., Djian P. (2004). Serial cultivation of chicken keratinocytes, a composite cell type that accumulates lipids and synthesizes a novel β -keratin. *Differentiation*, 72 (4): 123–137.
- Wang G., Zhang H., Zhao Y. (2005). Noggin and bFGF cooperate to maintain the pluripotency of human embryonic stem cells in the absence of feeder layers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 330 (3): 934–942.
- Wang Y., Brooks C.F., Jones S.A., Olliff L.K., Morgan M., Speksnijder G.L., Foley C., Harvey A.J. (2006). Progress toward the culture and transformation of chicken blastodermal cells. *Stem Cells*, 24 (7): 1638–1645.
- Wartalski K., Gorczyca G., Wiater J., Tabarowski Z., Duda M. (2021). Porcine ovarian cortex-derived putative stem cells can differentiate into endothelial cells *in vitro*. *Histochem. Cell Biol.*, 156 (4): 349–362.
- Woodcock M.E., Gheyas A.A., Mason A.S., Nandi S., Taylor L., Sherman A., Smith J., Burt D.W., Hawken R., McGrew M.J. (2019). Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 116 (42): 20930–20937.
- Wu H., Guan W., Li H., Ma Y. (2008). Establishment and characteristics of white ear lobe chicken embryo fibroblast line and expression of six fluorescent proteins in the cells. *Cell Biol. Int.*, 32 (12): 1478–1485.
- Xiong C., Wang M., Ling W., Xie D., Chu X., Li Y., Huang Y., Li T., Otieno E., Qiu X., Xiao X. (2020). Advances in isolation and culture of chicken embryonic stem cells *in vitro*. *Cell. Reprogram.*, 22 (2): 43–54.
- Zhang L., Wu Y., Li X., Wei S., Xing Y., Lian Z., Han H. (2018). An alternative method for long-term culture of chicken embryonic stem cell *in vitro*. *Stem Cells Int.* 2018: 2157451.

DEVELOPMENT OF THE EFFECTIVE STRATEGY USED FOR ESTABLISHMENT OF MITOTICALLY STABLE LINES OF EMBRYONIC STEM CELLS DERIVED FROM BLASTODERM ISOLATED FROM *IN VIVO*-FERTILIZED EGGS OF DOMESTIC FOWL (*GALLUS GALLUS DOMESTICUS*)

Marcin Samiec, Monika Trzcińska, Katarzyna Połtowicz, Małgorzata Duda

SUMMARY

Pluripotent embryonic stem cell (ESC) lines established from the blastoderm, which had been isolated from embryonic discs of the domestic fowl (*Gallus gallus domesticus*) embryos at the stage X not only serve as an innovative model for studying avian embryonic development but are also gaining increasing importance, both in the context of safeguarding various populations outside their natural environment and in preserving the genetic diversity of poultry species and breeds. The main objective of this study was to develop an efficient protocol for: (1) isolating chicken BCs; (2) generating stable BC-derived ESC lines under *ex ovo* conditions; and (3) determining their pluripotency-related proteomic signatures based on the expression of such biomarkers as Oct-3/4 (octamer-binding transcription factor-3/4, also designated as POU5F1; a member of the family of POU (Pit-Oct-Unc)-domain- and homeodomain-containing transcription factors) and Sox2 (sex-determining region Y (SRY)-box 2; a member of the high mobility group (HMG)-box family of DNA-binding transcription factors). ESCs, which had been established from BCs isolated from fertilized eggs at the stage X, were cultured for a minimum of 15 passages under *ex vivo* conditions. During the *ex-ovo* expansion of blastoderm-derived ESCs, their adhesive and proliferative capabilities were compared depending on the type of vessels utilized for *in vitro* culture. By using Western-blot analysis and immunofluorescence staining, the proteomic landscapes have been examined for the pluripotency-related biomarkers that have been represented by the members of a family of homeobox (Hox) transcription factors (Oct-3/4 and Sox2), which display the presence of homeodomain, i.e., a conserved 60-amino acid helix-turn-helix motif-containing and DNA-binding domain. Throughout the extended *in vitro* culture, chicken B-ESCs have been found to retain the typical morphology of embryonic stem cells. Moreover, the expression of selected pluripotency-related markers of stemness was confirmed at the proteomic levels based on the detecting the presence of such homeotic (homeodomain/homeobox-containing) transcription factors as Oct-3/4 and Sox2. Finally, the use of 8-well Ibidi glass-bottomed microplates coated with synthetic polymeric substrate (poly-*L*-lysine), and cell culture dishes comprised of polystyrene plastic and coated with type I collagen (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes) exerted a significant impact on the proliferative capabilities of chicken B-ESC lines.

Key words: domestic fowl, blastodermal cells, embryonic stem cells, pluripotency markers, homeotic (homeobox) transcription factors, Oct-3/4, Sox2