

KIERUNKI i MOŻLIWOŚCI WYKORZYSTANIA MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO POCHODZĄCEGO OD ZWIERZĄT WOLNOŻYJĄCYCH

Monika Trzcńska*, Marcin Samiec*

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

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

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

ORCID

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

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

Niniejsza praca naukowa uzyskała finansowanie ze środków zadania badawczego nr 01-19-13-21, realizowanego w Instytucie Zootechniki – Państwowym Instytucie Badawczym (IZ-PIB).

Abstrakt

Biorąc pod uwagę filogenetyczny rozwój kręgowców (ssaków, ptaków, ryb), wiele taksonów reprezentujących typ strunowce (Chordata) oraz podtyp kręgowce (Vertebrata) posiada aktualnie status gatunków zagrożonych lub skrajnie zagrożonych wyginięciem bądź wymarłych w stanie dzikim. Dlatego też zabezpieczanie ex vivo oraz charakterystyka biologiczna i molekularna linii komórek somatycznych i macierzystych wyizolowanych z różnych eksplantów tkankowych pochodzących od zwierząt wolnożyjących umożliwi: 1) opracowanie modeli badawczych ex vivo na bazie inżynierii hodowli komórkowych i toksykologii cytologicznej oraz 2) wykorzystanie zgromadzonego materiału biologicznego w technologiach wspomaganego rozrodu zwierząt (ARTs; ang. assisted reproductive technologies), mających zastosowanie w programach ochrony ex situ i restytucji zagrożonych wyginięciem przedstawicieli kręgowców. Uwzględniając powyższe uwarunkowania, celem niniejszej pracy jest zaprezentowanie możliwości wielokierunkowej oceny komórkowych modeli in vitro różnych gatunków zwierząt dziko żyjących (w tym ich krajowych przedstawicieli, m.in. dzików, saren, jeleni, lisów, jenotów, ptactwa łownego, ryb słodkowodnych) dla potrzeb: 1) identyfikacji i poznania czynników oraz mechanizmów cytologicznych, biochemicznych, molekularnych, epigenetycznych, transkryptomicznych i proteomicznych; oraz 2) określenia wpływu różnych suplementów troficznych i mitogennych oraz toksyn środowiskowych na procesy wewnątrzkomórkowe, ze szczególnym uwzględnieniem komórek i tkanek układu rozrodczego. Źródłem tkanek i narządów niezbędnych do wyprowadzania linii komórek somatycznych i macierzystych mogą być męskie i żeńskie osobniki w różnym wieku, będące przedstawicielami wybranych gromad kręgowców i wywodzące się z krajowych subpopulacji różnych gatunków dziko żyjących: 1) ssaków – dziki, sarny, jelenie, jenoty, lisy i inne; oraz 2) ptaków – bażanty, kuropatwy i inne;

a także 3) ryb słodkowodnych (roślinożernych i drapieżnych). W oparciu o wyprowadzone linie komórkowe mogą zostać opracowane modele badawcze *in vitro* na potrzeby inżynierii komórkowej i tkankowej oraz biotechnologii i toksykologii reprodukcyjnej. W tym celu stabilne mitotycznie linie komórek somatycznych i multipotentnych komórek macierzystych różnego pochodzenia można poddać: 1) ocenie strukturalno-funkcjonalnej w oparciu o szeroki panel metod m.in. z zakresu: biologii molekularnej, transkryptomiki, proteomiki, epigenomiki, immunocytochemii oraz 2) biofizycznym i biochemicznym testom funkcjonalnym z wykorzystaniem technik nanotechnologii i toksykologii molekularnej. Podsumowując, opracowane w ramach realizacji niniejszego profilu prac badawczych komórkowe modele *in vitro* zwierząt dziko żyjących można ekstrapolować na inne gatunki ssaków, w tym człowieka oraz zwierząt hodowlanych, szczególnie tych ich przedstawicieli, które cechuje bliski stopień pokrewieństwa filogenetycznego z odpowiednimi gatunkami zwierząt wolnożyjących. Pomocna w tym kontekście będzie również szczegółowa charakterystyka porównawcza modeli komórkowych zwierząt dziko żyjących i hodowlanych.

Słowa kluczowe: gatunki zwierząt dziko żyjących, modele badawcze *ex vivo*, komórki somatyczne i macierzyste pochodzące od dorosłych osobników, biotechnologia i toksykologia reprodukcyjna

Wstęp

Na obecnym etapie ewolucji biologicznej wielu taksonomicznych przedstawicieli kręgowców (ssaki, ptaki, ryby) posiada status gatunków zagrożonych lub skrajnie zagrożonych wyginięciem bądź wymarłych w stanie dzikim. Przyczynami drastycznego zanikania czy wymierania tak wielu gatunków ssaków, ptaków i ryb w środowisku naturalnym wydają się być:

- 1) rabunkowa gospodarka antropogeniczna skutkująca wysokim stopniem ingerencji człowieka w siedliska bytowania poszczególnych gatunków/podgatunków (Comizzoli i Holt, 2019; Perry i Mitchell, 2022);
- 2) rolnicza i przemysłowa dewastacja biotopów zasiedlanych przez dziko żyjące gatunki;
 - a) eutrofizacja wód śródlądowych i akwenów morskich, wywołana nadmierną emisją dwutlenku węgla i innych gazów cieplarnianych oraz globalnym ocieplaniem stref klimatycznych i podwyższaniem temperatury wód powierzchniowych;
 - b) zanieczyszczenia w obrębie ekosystemów wodnych, wód gruntowych, w organizmach roślin uprawnych i pastewnych oraz wolnożyjących i udomowionych zwierząt roślino-, mięso- i wszystkożernych – spowodowane bioakumulacją, jak również brakiem biodegradacji związków o charakterze cytotoksycznym np. toksyn syntetyzowanych przez sinice/cyjanobakterie toksynotwórcze; tj. cyjanotoksyn (Thawabteh i in., 2023; Shi i in., 2023; Kurbatova i in., 2023; Roy i in., 2023);
- 3) kłusownictwo (Bolton i in., 2022; Hildebrandt i in., 2021);
- 4) degradacja zagrożonych nisz przyrodniczych zasiedlanych przez poszczególne gatunki/podgatunki kręgowców wskutek zmian klimatycznych i klęsk żywiołowych (Roy i in., 2023; Moreira-González i in., 2023);
- 5) epidemiczne i pandemiczne transmisje patogenów wywołujących wewnętrz- i międzygatunkowe choroby zakaźne zwierząt (Caroli i Pizzi, 2012; Bolton i in., 2022).

Praktyczne uzasadnienie podjęcia prac badawczych z użyciem komórek, tkanek i narządów wyizolowanych od zwierząt dziko żyjących w różnych kierunkach biotechnologii i toksykologii reprodukcyjnej, a także w szeroko zakrojonych badaniach interdyscyplinarnych

Zmniejszające się w szybkim tempie siedliska występowania wielu ginących gatunków/podgatunków kręgowców w efekcie zwiększania się powierzchni zurbanizowanych i rolniczych ekosystemów stanowią główną przyczynę ograniczenia dryftu genetycznego między dziko bytującymi populacjami/subpopulacjami danego gatunku kręgowców. To z kolei przyczynia się do obniżenia wewnątrz- i międzypopulacyjnej zmienności genotypowej wśród wielu zagrożonych wyginięciem przedstawicieli kręgowców. Gwałtowny spadek częstości i zasięgu występowania zagrożonych jednostek taksonomicznych kręgowców może również prowadzić do utraty równowagi biologicznej lub postępującego zaniku bioróżnorodności na skutek całkowitej zagłady danego gatunku (Comizzoli i Holt, 2019; Thongphakdee i in., 2020; Jacques i in., 2023).

Dlatego też rozwój i optymalizacja metod zabezpieczania *ex situ* materiału biologicznego pochodzącego od zwierząt dziko żyjących daje możliwość opracowania nowych modeli *in vitro* inżynierii komórkowej i tkankowej na potrzeby:

- 1) ochrony różnorodności gatunkowej;
- 2) zachowania i stabilizacji równowagi ekosystemowej między biocenozą a biotopem;
- 3) redukcji liczebności populacji gatunków wysoce inwazyjnych o wysokich zdolnościach adaptacji w ekosystemach antropogenicznych i zurbanizowanych (dziki, lisy, jenoty) (Woelders i in., 2012; Ryder i Onuma, 2018; Gavin-Plagne i in., 2020; Praxedes i in., 2021; Soglia i in., 2021).

Szczegółowa specyfikacja kierunków badawczych z wykorzystaniem materiału biologicznego pozyskanego od wybranych gatunków zwierząt bytujących w krajowych ekosystemach naturalnych

W tym kontekście działania Zakładu Biotechnologii Rozrodu Zwierząt IZ-PIB ukierunkowane na zabezpieczanie *ex vivo* oraz charakterystykę strukturalno-funkcjonalną aktywnych proliferacyjnie linii komórek somatycznych i macierzystych wyizolowanych z różnych eksplantów tkankowych pochodzących od zwierząt wolnożyjących (tab. 1) stanowią atrakcyjny profil badawczy. Niniejszy panel badań umożliwi opracowanie modeli badawczych na bazie różnych systemów hodowli i toksykologii *in vitro*. Takie komórkowe modele *ex vivo* mogą być z powodzeniem ekstrapolowane na eksperymentalne modele komórkowe u człowieka oraz różnych gatunków kręgowców udomowionych, w tym zwierząt gospodarskich. Wspomniane modele posłużą m.in. do badania wpływu toksyn środowiskowych oraz związków biotoksycznych syntetyzowanych przez sinice toksynogenne na linie komórkowe wyprowadzone z bioptatów wyizolowanych z różnych tkanek i organów, w tym tkanek i narządów układu rozrodczego. Modele takie przyczynią się również do ułatwienia ścieżek dokomórkowego transportu związków egzogennych o właściwościach wspomagających funkcje komórek za pośrednictwem eksperymentalnie skonstruowanych nanocząsteczek nośnikowych (Kikuchi i in., 2016; Chen i in., 2018; Borges i in., 2020; Son i in., 2021; Dua i in., 2021; Elyasi Gorji i in., 2021).

Tabela 1. Biorepozytoria IZ-PIB w postaci zabezpieczonych *ex vivo* linii komórek macierzystych i somatycznych wywodzących się z biopłatów tkankowych pozyskanych od wybranych gatunków ssaków dziko żyjącychTable 1. The biorepositories in the form of *ex vivo* protected adult stem and somatic cell lines originating from the selected wild mammalian species deposited in the National Research Institute of Animal Production in Poland

Gatunek Species	Pochodzenie komórek macierzystych lub somatycznych The provenance of adult stem or somatic cells	Metoda zabezpieczenia <i>ex vivo</i> Method of <i>ex vivo</i> protection	Liczba linii komórkowych Number of cell lines	Liczba dawczyń Number of female donors	Liczba dawców Number of male donors
Dzik euroazjatycki Wild boar	AT-MSCs	Kriokonserwacja Cryoconservation	6	-	4
	ES-FCs		8	-	6
	EC-CTs		9	-	7
Jenot azjatycki Common raccoon dog	AT-MSCs		4	4	-
	ES-FCs		5	4	-
	EC-CTs		4	4	-
Lis rudy (pospolity) European red fox	AT-MSCs		6	1	2
	ES-FCs		3	2	1
	EC-CTs		6	2	3
Sarna europejska European roe deer	AT-MSCs	6	-	2	
	ES-FCs	5	-	3	
	EC-CTs	6	-	3	

AT-MSCs – Mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z tkanki tłuszczowej (ang. adipose tissue-derived mesenchymal stem cells); ES-FCs – Komórki fibroblastyczne pochodzące z tkanki skórnej małżowin usznych (ang. ear skin-derived fibroblast cells); EC-CTs – Chondrocyty pochodzące z tkanki chrzęstnej małżowin usznych (ang. ear cartilage-derived chondrocytes).

Biorąc powyższe pod uwagę, stworzenie modeli badawczych *ex vivo* dla identyfikacji i poznania molekularnej sieci czynników i procesów wewnątrzkomórkowych jest całkowicie uzasadnione z uwagi na fakt, że komórki somatyczne i macierzyste różnego pochodzenia (w tym także narządów i tkanek układu rozrodczego osobników obojga płci) stanowią źródło komórek-dawców jąder w klonowaniu somatycznym różnych gatunków zwierząt dziko żyjących i hodowlanych (Li i in., 2013; Xu i in., 2019; Jeong i in., 2020; Hildebrandt i in., 2021; Nguyen i in., 2021; Comizzoli i in., 2022). Z kolei klonowanie somatyczne w układzie wewnątrz- i międzygatunkowym może stanowić skuteczne narzędzie badawcze wykorzystywane do ochrony *ex situ* i biotechnologicznego ratowania ginących lub wymarłych gatunków kręgowców (Magalhães i in., 2020; Wang i in., 2020; Nguyen i in., 2021; Thongphakdee i in., 2020; Hildebrandt i in., 2021; Samiec i Skrzyszowska, 2021). Nie bez znaczenia pozostają w tym zakresie również metody biotechnologicznie wspomaganiej restytucji zagrożonych wyginięciem lub wymarłych przedstawicieli kręgowców, które są ukierunkowane na wtórną introdukcję i odtwarzanie bioróżnorodności gatunków/podgatunków w wielu niszach ekosystemów naturalnych, w tym tych pozostających pod ścisłą protekcją człowieka (np. rezerwach przyrody) (León-Quinto i in., 2014; Comizzoli, 2015; De Oliveira Silva i in., 2021; Sun i in., 2022; Hu i in., 2022).

W tym aspekcie istotna jest kompleksowa ocena komórkowych modeli *in vitro* różnych gatunków zwierząt dziko żyjących (w tym ich krajowych przedstawicieli, m.in. dzików, saren, jeleni, lisów, jenotów, ptactwa łownego, ryb słodkowodnych) pod kątem identyfikacji i poznania czynników i mechanizmów molekularnych, epigenetycznych, transkryptomicznych i proteomicznych, a także pod kątem badania wpływu różnych suplementów troficznych i mitogennych oraz toksyn środowiskowych na procesy wewnątrzkomórkowe (Thomas i in., 2022; Yan i in., 2022; Afshar i in., 2023; Lautaoja i in., 2023). W tym ostatnim przypadku niezwykle przydatnym narzędziem jest również określenie tempa wchłaniania, a także ułatwienie transportu dkomórkowego egzogennych związków o charakterze cytotoksycznym za pośrednictwem nanocząstek nośnikowych, jak również ocena kinetyki tworzenia i wydzielania eksosomów (mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych) wraz z rozpoznaniem ich składu biochemicznego (rozkład ilościowy fosfolipidów, glikolipidów, białek i cząsteczek

miRNA jako modulatorów/regulatorów informacji epigenetycznej) (Zhang i in., 2015; Yoo i in., 2015; Rincon-Benavides i in., 2023; Williams i in., 2023). Pozwoli to na stworzenie modeli badawczych z udziałem hodowli komórkowych pochodzących od zwierząt wolnożyjących, w tym ryb słodkowodnych bytujących w akwenach śródlądowych zanieczyszczonych w następstwie eutrofizacji wywołanej lawinowym oddziaływaniem endotoksyn (mikrocystyn, nodularyn), syntetyzowanych przez sinice/cyjanobakterie toksynogenne (*Microcystis aeruginosa*, *Nodularia spumigena*) (Yu i in., 2023; Kurbatova i in., 2023; Roy i in., 2023).

Badanie mechanizmów toksyczności zewnątrz- i wewnątrzkomórkowej, spowodowanej toksynami środowiskowymi w oparciu o modele *in vitro* ma szczególne znaczenie w kontekście bioakumulacji tych związków cytotoksycznych w organizmach różnych gatunków kręgowców wodnych i lądowych, w tym człowieka i zwierząt hodowlanych (Nowruzi i in., 2023; Schwark i in., 2023; Shi i in., 2023). Przydatnym narzędziem badawczym dla rozpoznania różnych ścieżek molekularnych wchłaniania cytotoksyn, jak i oddziaływania suplementów zewnątrzkomórkowych bądź nanocząstek nośnikowych opłaszczonych suplementami zewnątrzkomórkowymi lub toksynami środowiskowymi lub cyjanotoksynami, na namnażane w warunkach *ex vivo* komórki somatyczne i macierzyste jest połączenie charakterystyki profilu transkryptomicznego RNA i miRNA oraz profilu proteomicznego (za pomocą analiz RT-qPCR i Western blot), z immunolokalizacją białek czy glikoprotein w specyficznych regionach i organellach wewnątrzkomórkowych, włącznie ze szkieletem błonowym (membranoszkieletem) i cytoszkieletem, jak również w formowanych i eksternalizowanych przez komórki eksosomach (Han i in., 2016; Yoo i in., 2017; Samiec i in., 2022; Yan i in., 2022; Yu i in., 2023).

Opracowane w ramach niniejszego kierunku prac badawczych komórkowe modele *in vitro* zwierząt dziko żyjących można ponadto ekstrapolować na inne gatunki ssaków, w tym człowieka oraz zwierząt udomowionych i hodowlanych, szczególnie tych ich przedstawicieli, których cechuje bliski stopień pokrewieństwa filogenetycznego z odpowiednimi gatunkami zwierząt wolnożyjących. Pomocna w tym zakresie będzie szczegółowa charakterystyka porównawcza takich modeli komórkowych na poziomie cytofizjologicznym i molekularnym.

Podsumowanie, wnioski końcowe i przyszłe cele badawcze

Opracowanie skutecznych metod zabezpieczania komórek i tkanek pochodzących od zwierząt dziko żyjących, w tym różnych gatunków bytujących w ekosystemach krajowych, a także opracowanie modeli *in vitro* inżynierii komórkowej i tkankowej z wykorzystaniem biotechnologii, toksykologii oraz nanotechnologii stanowi nowatorski kierunek prac badawczo-rozwojowych. Te ostatnie odgrywają szczególnie istotną rolę dla ochrony różnorodności gatunkowej, zachowania równowagi biotopowej i biocenotycznej oraz dla działań ukierunkowanych na redukcję liczebności populacji gatunków wysoce inwazyjnych o wysokich zdolnościach adaptacji w ekosystemach antropogenicznych i zurbanizowanych (dziki, lisy, jenoty).

Stworzenie modeli badawczych *ex vivo* dla identyfikacji i poznania molekularnej sieci czynników i procesów wewnątrzkomórkowych jest uzasadnione z uwagi na fakt, że komórki somatyczne i macierzyste różnego pochodzenia (w tym również te wywodzące się z tkanek i narządów układu rozrodczego osobników obojga płci) stanowią źródło komórek-dawców jąder w klonowaniu somatycznym różnych gatunków zwierząt dziko żyjących i hodowlanych. z tego powodu zabezpieczanie *ex vivo* oraz charakterystyka strukturalno-funkcjonalna linii komórek somatycznych i macierzystych wyizolowanych z różnych eksplantów tkankowych pochodzących od zwierząt wolnożyjących stanowi atrakcyjny kierunek badawczy, umożliwiający opracowanie modeli badawczych z udziałem inżynierii hodowli komórkowych oraz toksykologii molekularnej dzikich gatunków kręgowców (ssaków, ptaków i ryb). Takie komórkowe modele *ex vivo* mogą być z powodzeniem ekstrapolowane na eksperymentalne

i przedkliniczne modele komórkowe u człowieka oraz innych gatunków kręgowców, w tym zwierząt hodowlanych, a w szczególności tych, które są blisko spokrewnione taksonomicznie z ich odpowiednikami bytującymi w ekosystemach naturalnych i niepozostających pod wpływem ingerencji czynników antropogenicznych.

W tym kontekście wydaje się, że warunkiem *sine qua non* przyszłych prac eksperymentalnych i aplikacyjnych w ramach podjętego panelu badań jest kompleksowa ocena komórkowych modeli *in vitro* różnych gatunków zwierząt dziko żyjących (w tym ich krajowych przedstawicieli, m.in. dzików, saren, jeleni, lisów, jenotów, ptactwa łownego, ryb słodkowodnych) pod kątem identyfikacji i poznania czynników i mechanizmów molekularnych, epigenetycznych, transkryptomicznych i proteomicznych, a także pod kątem badania wpływu różnych suplementów troficznych i mitogennych oraz toksyn środowiskowych na procesy wewnątrzkomórkowe, ze szczególnym uwzględnieniem komórek i tkanek układu rozrodczego.

Piśmiennictwo

- Afshar Y., Ma F., Quach A., Jeong A., Sunshine H.L., Freitas V., Jami-Alahmadi Y., Helaers R., Li X., Pellegrini M., Wohlschlegel J.A., Romanoski C.E., Vikkula M., Iruela-Arispe M.L. (2023). Transcriptional drifts associated with environmental changes in endothelial cells. *eLife*, 12: e81370.
- Bolton R.L., Mooney A., Pettit M.T., Bolton A.E., Morgan L., Drake G.J., Appeltant R., Walker S.L., Gillis J.D., Hvilsom C. (2022). Resurrecting biodiversity: advanced assisted reproductive technologies and biobanking. *Reprod. Fertil.*, 3: R121–R146.
- Borges A.A., Lira G.P.O., Nascimento L.E., Santos M.V.O., Oliveira M.F., Silva A.R., Pereira A.F. (2020). Isolation, characterization, and cryopreservation of collared peccary skin-derived fibroblast cell lines. *PeerJ*, 8: e9136.
- Caroli A.M., Pizzi F. (2012). Livestock biodiversity: from genes to animal products through safeguard actions. *Theor. Biol. Forum.*, 105: 71–82.
- Chen F., Zhao C., Zhao Y., Li L., Liu S., Zhu Z., Guan W. (2018). The biological characteristics of sheep umbilical cord mesenchymal stem cells. *Can. J. Vet. Res.*, 82: 216–224.
- Comizzoli P. (2015). Biobanking efforts and new advances in male fertility preservation for rare and endangered species. *Asian J. Androl.*, 17: 640–645.
- Comizzoli P., Holt W.V. (2019). Breakthroughs and new horizons in reproductive biology of rare and endangered animal species. *Biol. Reprod.*, 101: 514–525.
- Comizzoli P., He X., Lee P.C. (2022). Long-term preservation of germ cells and gonadal tissues at ambient temperatures. *Reprod. Fertil.*, 3: R42–R50.
- De Oliveira Silva R., Cortes Gardyn O., Hiemstra S.J., Marques J.G.O., Tixier-Boichard M., Moran D. (2021). *Ex situ* and *in situ* data for endangered livestock breeds in Spain. *Data Brief*, 35: 106805.
- Dua S., Sharma P., Saini M., Rawat N., Rajendran R., Bansal S., Wakil A.M., Beniwal M., Parashar A., Bajwa K.K., Selokar N.L., Kumar R., Kumar D., Yadav P.S. (2021). Cryobanking of primary somatic cells of elite farm animals – a pilot study in domesticated water buffalo (*Bubalus bubalis*). *Cryobiology*, 98: 139–145.
- Elyasi Gorji Z., Farzaneh P., Nasimian A., Ganjibakhsh M., Izadpanah M., Farghadan M., Vakhshiteh F., Rahmati H., Shahzadeh Fazeli S.A., Khaledi H., Khaledi H., Daneshvar Amoli A. (2021). Cryopreservation of Iranian Markhoz goat fibroblast cells as an endangered national genetic resource. *Mol. Biol. Rep.*, 48: 6241–6248.
- Gavin-Plagne L., Perold F., Osteil P., Voisin S., Moreira S.C., Combourieu Q., Saïdou V., Mure M., Louis G., Baudot A., Buff S., Joly T., Afanassieff M. (2020). Insights into species preservation: Cryobanking of rabbit somatic and pluripotent stem cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 7285.

- Han J.W., Jeong J.K., Gurunathan S., Choi Y.J., Das J., Kwon D.N., Cho S.G., Park C., Seo H.G., Park J.K., Kim J.H. (2016). Male- and female-derived somatic and germ cell-specific toxicity of silver nanoparticles in mouse. *Nanotoxicology*, 10: 3613–73.
- Hildebrandt T.B., Hermes R., Goeritz F., Appeltant R., Colleoni S., De Mori B., Diecke S., Drukker M., Galli C., Hayashi K., Lazzari G., Loi P., Payne J., Renfree M., Seet S., Stejskal J., Swegen A., Williams S.A., Zainuddin Z.Z., Holtze S. (2021). The ART of bringing extinction to a freeze – History and future of species conservation, exemplified by rhinos. *Theriogenology*, 169: 76–88.
- 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: e74036.
- Jacques A., Leroy G., Rognon X., Verrier E., Tixier-Boichard M., Restoux G. (2023). Reintroducing genetic diversity in populations from cryopreserved material: the case of Abondance, a French local dairy cattle breed. *Genet. Sel. Evol.*, 55: 28.
- Jeong P.S., Sim B.W., Park S.H., Kim M.J., Kang H.G., Nanjidsuren T., Lee S., Song B.S., Koo D.B., Kim S.U. (2020). Chaetocin improves pig cloning efficiency by enhancing epigenetic reprogramming and autophagic activity. *Int. J. Mol. Sci.*, 21: 4836.
- Kikuchi K., Kaneko H., Nakai M., Somfai T., Kashiwazaki N., Nagai T. (2016). Contribution of *in vitro* systems to preservation and utilization of porcine genetic resources. *Theriogenology*, 86: 170–175.
- Kurbatova S., Berezina N., Sharov A., Chernova E., Kurashov E., Krylova Y., Yershov I., Mavrin A., Otyukova N., Borisovskaya E., Fedorov R. (2023). Effects of algicidal macrophyte metabolites on cyanobacteria, microcystins, other plankton, and fish in microcosms. *Toxins*, 15: 529.
- Lautaoja J.H., Turner D.C., Sharples A.P., Kivelä R., Pekkala S., Hulmi J.J., Ylä-Outinen L. (2023). Mimicking exercise in vitro: effects of myotube contractions and mechanical stretch on omics. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 324: C886–C892.
- León-Quinto T., Simón M.A., Cadenas R., Martínez A., Serna A. (2014). Different cryopreservation requirements in foetal versus adult skin cells from an endangered mammal, the Iberian lynx (*Lynx pardinus*). *Cryobiology*, 68: 227–233.
- Li Z., He X., Chen L., Shi J., Zhou R., Xu W., Liu D., Wu Z. (2013). Bone marrow mesenchymal stem cells are an attractive donor cell type for production of cloned pigs as well as genetically modified cloned pigs by somatic cell nuclear transfer. *Cell. Reprogram.*, 15: 459–470.
- Magalhães L.C., Cortez J.V., Bhat M.H., Sampaio A.C.N.P.C., Freitas J.L.S., Duarte J.M.B., Melo L.M., Freitas V.J.F. (2020). *In vitro* development and mitochondrial gene expression in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) embryos obtained by interspecific somatic cell nuclear transfer. *Cell. Reprogram.*, 22: 208–216.
- Moreira-González A.R., Domit C., Rosa K.M.S., Mafra L.L. Jr. (2023). Occurrence of potentially toxic microalgae and diarrhetic shellfish toxins in the digestive tracts of green sea turtles (*Chelonia mydas*) from southern Brazil. *Harmful Algae*, 128: 102498.
- Nguyen V.K., Somfai T., Salamone D., Thu Huong V.T., Le Thi Nguyen H., Huu Q.X., Hoang A.T., Phan H.T., Thi Pham Y.K., Pham L.D. (2021). Optimization of donor cell cycle synchrony, maturation media and embryo culture system for somatic cell nuclear transfer in the critically endangered Vietnamese Ĩ pig. *Theriogenology*, 166: 21–28.
- Nowruzi B., Jalil B.S., Metcalf J.S. (2023). Antifungal screening of selenium nanoparticles biosynthesized by microcystin-producing *Desmonostoc alborizicum*. *BMC Biotechnol.*, 23: 41.

- Perry S.M., Mitchell M.A. (2022). Reptile assisted reproductive technologies: can ART help conserve 300 million years of evolution by preserving extant reptile biodiversity? *Reprod. Fertil. Dev.*, 34: 385–400.
- Praxedes É.A., Silva M.B., Oliveira L.R.M., Viana J.V.D.S., Silva A.R., Oliveira M.F., Pereira A.F. (2021). Establishment, characterization, and cryopreservation of cell lines derived from red-rumped agouti (*Dasyprocta leporina* Linnaeus, 1758) – a study in a wild rodent. *Cryobiology*, 98: 63–72.
- Rincon-Benavides M.A., Mendonca N.C., Cuellar-Gaviria T.Z., Salazar-Puerta A.I., Ortega-Pineda L., Blackstone B.N., Deng B., McComb D.W., Gallego-Perez D., Powell H.M., Higuera-Castro N. (2023). Engineered vasculogenic extracellular vesicles drive nonviral direct conversions of human dermal fibroblasts into induced endothelial cells and improve wound closure. *Adv. Ther. (Weinh)*, 6: 2200197.
- Roy S., Guljamow A., Dittmann E. (2023). Impact of temperature on the temporal dynamics of microcystin in *Microcystis aeruginosa* PCC7806. *Front. Microbiol.*, 14: 1200816.
- Ryder O.A., Onuma M. (2018). Viable cell culture banking for biodiversity characterization and conservation. *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, 6: 83–98.
- Samiec M., Skrzyszowska M. (2021). Extranuclear inheritance of mitochondrial genome and epigenetic reprogrammability of chromosomal telomeres in somatic cell cloning of mammals. *Int. J. Mol. Sci.*, 22: 3099.
- Samiec M., Wiater J., Wartalski K., Skrzyszowska M., Trzcińska M., Lipiński D., Jura J., Smorąg Z., Słomski R., Duda M. (2022). The relative abundances of human leukocyte antigen-E, α -galactosidase a and α -Gal antigenic determinants are biased by trichostatin A-dependent epigenetic transformation of triple-transgenic pig-derived dermal fibroblast cells. *Int. J. Mol. Sci.*, 23: 10296.
- Schwark M., Martínez Yereña J.A., Röhrborn K., Hrouzek P., Divoká P., Štenclová L., Delawska K., Enke H., Vorreiter C., Wiley F., Sippl W., Sobotka R., Saha S., Wilde S.B., Mareš J., Niedermeyer T.H.J. (2023). More than just an eagle killer: The freshwater cyanobacterium *Aetokthonos hydrillicola* produces highly toxic dolastatin derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 120: e2219230120.
- Shi Y., Almuhtaram H., Andrews R.C. (2023). Adsorption of per- and polyfluoroalkyl substances (PFAS) and microcystins by virgin and weathered microplastics in freshwater matrices. *Polymers*, 15: 3676.
- 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., Profitti M., Sacchi P., Cerolini S., Schiavone A. (2021). Genetic diversity of 17 autochthonous Italian chicken breeds and their extinction risk status. *Front. Genet.*, 14: 715656.
- Son Y.B., Jeong Y.I., Jeong Y.W., Yu X., Cai L., Choi E.J., Hossein M.S., Tinson A., Singh K.K., Rajesh S., Noura A.S., Hwang W.S. (2021). Vitrification of camel skin tissue for use as a resource for somatic cell nuclear transfer in *Camelus dromedarius*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 57: 487–492.
- 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: 115.
- Thawabteh A.M., Naseef H.A., Karaman D., Bufo S.A., Scrano L., Karaman R. (2023). Understanding the risks of diffusion of cyanobacteria toxins in rivers, lakes, and potable water. *Toxins*, 15: 582.
- Thomas P., Srivastava S., Udayashankara A.H., Damodaran S., Yadav L., Mathew B., Suresh S.B., Mandal A.K., Srikantia N. (2022). RhoC in association with TET2/WDR5 regulates cancer stem cells by epigenetically modifying the expression of pluripotency genes. *Cell. Mol. Life Sci.*, 80: 1.

- Thongphakdee A., Sukparangsi W., Comizzoli P., Chatdarong K. (2020). Reproductive biology and biotechnologies in wild felids. *Theriogenology*, 150: 360–373.
- Wang X., Qu J., Li J., He H., Liu Z., Huan Y. (2020). Epigenetic reprogramming during somatic cell nuclear transfer: recent progress and future directions. *Front. Genet.*, 11: 205.
- Williams T., Salmanian G., Burns M., Maldonado V., Smith E., Porter R.M., Song Y.H., Samsonraj R.M. (2023). Versatility of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles in tissue repair and regenerative applications. *Biochimie*, 207: 33–48.
- Woelders H., Windig J., Hiemstra S.J. (2012). How developments in cryobiology, reproductive technologies and conservation genomics could shape gene banking strategies for (farm) animals. *Reprod. Domest. Anim.*, 47: 264–273.
- Xu L., Mesalam A., Lee K.L., Song S.H., Khan I., Chowdhury M.M.R., Lv W., Kong I.K. (2019). Improves the *in vitro* developmental competence and reprogramming efficiency of cloned bovine embryos by additional complimentary cytoplasm. *Cell. Reprogram.*, 21: 51–60.
- Yan X.R., Shi T., Xiao J.Y., Liu Y.F., Zheng H.L. (2022). *In vitro* transdifferentiated signatures of goat preadipocytes into mammary epithelial cells revealed by DNA methylation and transcriptome profiling. *J. Biol. Chem.*, 298: 102604.
- Yoo J., Noh M., Kim H., Jeon N.L., Kim B.S., Kim J. (2015). Nanogrooved substrate promotes direct lineage reprogramming of fibroblasts to functional induced dopaminergic neurons. *Biomaterials*, 45: 36–45.
- Yoo J., Chang Y., Kim H., Baek S., Choi H., Jeong G.J., Shin J., Kim H., Kim B.S., Kim J. (2017). Efficient direct lineage reprogramming of fibroblasts into induced cardiomyocytes using nanotopographical cues. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 13: 269–279.
- Yu C., Zhang M., Xiong Y., Wang Q., Wang Y., Wu S., Hussain S., Wang Y., Zhang Z., Rao N., Zhang S., Zhang X. (2023). Comparison of miRNA transcriptome of exosomes in three categories of somatic cells with derived iPSCs. *Sci. Data*, 10: 616.
- Yu S., Xu C., Tang T., Zhang Y., Effiong K., Hu J., Bi Y., Xiao X. (2023). Down-regulation of iron/zinc ion transport and toxin synthesis in *Microcystis aeruginosa* exposed to 5,4'-dihydroxyflavone. *J. Hazard. Mater.*, 460: 132396.
- Zhang X.F., Choi Y.J., Han J.W., Kim E., Park J.H., Gurunathan S., Kim J.H. (2015). Differential nanoreprotoxicity of silver nanoparticles in male somatic cells and spermatogonial stem cells. *Int. J. Nanomedicine*, 10: 1335–1357.

DIRECTIONS AND POSSIBILITIES OF USING BIOLOGICAL MATERIAL DERIVED FROM FREE-LIVING ANIMALS

Monika Trzcińska, Marcin Samiec

SUMMARY

Considering the phylogenetic development of vertebrates (mammals, birds, fish), many taxa representing the phylum of chordates (*Chordata*) and the subphylum of vertebrates (*Vertebrata*) currently have the status of endangered or extremely endangered species or are extinct in the wild. Therefore, *ex vivo* preservation and biological and molecular characterization of somatic and stem cell lines isolated from various tissue explants originating from free-living animals will enable: 1) the development of *ex vivo* research models based on cell culture engineering and cytological toxicology, and 2) the use of the collected biological material in assisted reproductive technologies (ARTs), applicable to the programs intended for the *ex situ* conservation and restoration of endangered vertebrate representatives. Taking into account the above considerations, the aim of this work is to present the possibilities of multifaceted evaluation of *in vitro* cell culture models of various wildlife species (including wild boars, roe deer, red deer, red foxes, raccoon dogs, wildfowl and fresh-water fish) for the purposes of: 1) identifying and exploring the cytological, biochemical, molecular, epigenetic, transcriptomic and proteomic factors and mechanisms; and 2) determining the effects of a broad spectrum of trophic and mitogenic supplements and environmental toxins on intracellular processes, with particular emphasis on cells and tissues of the reproductive system. The source of tissues and organs indispensable for establishment of somatic and stem cell lines can be male and female specimens at different age, being representatives of the selected vertebrate classes and derived from native subpopulations of a variety of wildlife species: 1) mammals – wild boars, roe deer, red deer, raccoon dogs, red foxes and others; and 2) birds – pheasants, partridges and others; as well as 3) fresh-water fish (herbivorous and carnivorous). Based on the established cell lines, *in vitro* research models focused on cell and tissue engineering and reproductive biotechnology and toxicology can be elaborated. For this reason, mitotically stable somatic cell lines and multipotent stem cell lines of various origins can be subjected to: 1) structural-functional assessment mediated by a broad panel of methods in such research fields as molecular biology, transcriptomics, proteomics, epigenomics, immunocytochemistry, among others, and 2) biophysical and biochemical functional tests using nanotechnology and molecular toxicology techniques. Summing up, the *in vitro* cell culture engineering models in wildlife species, which will have been developed within the framework of the implementation of this research work profile, can be extrapolated to other mammalian species, including humans and farmed livestock species, especially those of their representatives that have a close degree of phylogenetic relatedness with the corresponding free-living species. A detailed comparative characterization of cell culture models between wildlife and livestock species will be also helpful in this regard.

Keywords: wildlife species, *ex vivo* research models, adult somatic and stem cells, reproductive biotechnology and toxicology