

## BIOINŻYNIERIA ZARODKOWYCH KOMÓREK MACIERZYSTYCH WYBRANYCH GATUNKÓW DROBIU HODOWLANEGO – POTENCJAŁ NAUKOWO-BADAWCZY I APLIKACYJNY

Marcin Samiec\*, Monika Trzcńska\*

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

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

Niniejsza praca naukowa uzyskała finansowanie ze środków zadania badawczego nr 01-19-12-21, realizowanego w Instytucie Zootechniki – Państwowym Instytucie Badawczym (IZ-PIB).

### Abstrakt

*Na obecnym etapie badań niezbędne jest zarówno przyśpieszenie prac nad stworzeniem strategii badawczych typu „game changer”, pozwalających na znaczącą poprawę wydajności otrzymywania stabilnych – pod względem potencjału proliferacyjnego i cech pluripotencji – blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) kury domowej, jak i optymalizacja uprzednio opracowanych metod wyprowadzania i hodowli namnażających komórek B-ESCs, w wielu przypadkach w większym lub mniejszym stopniu suboptymalnych, a także w niedostatecznym stopniu powtarzalnych pod kątem uzyskiwanej efektywności. Należy również wspomnieć o braku jakichkolwiek postępów w opracowaniu procedur pozwalających na efektywną i trwałą cytodyferencjację ex ovo komórek B-ESCs kury domowej, a także o braku jakichkolwiek metod pozajajowego wyprowadzania, namnażania, pluripotentnej stabilizacji czy też różnicowania komórek B-ESCs innych gatunków ptaków, w tym innych niż kura domowa gatunków drobiu hodowlanego. W ramach niniejszej pracy będą zaprezentowane działania mające na celu opracowanie zupełnie nowych procedur badawczych ukierunkowanych na stworzenie innowacyjnych modeli in vitro wyprowadzania blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) wybranych gatunków drobiu hodowlanego (kura, kaczka, gęś) na potrzeby:*

*1) określenia warunków fizyko-chemicznych i biologicznych: izolacji, adhezji, proliferacji, zewnątrzkomórkowej stabilizacji fenotypowych cech pluripotencji oraz systemów różnicowania (cytodyferencjacji) ex ovo komórek B-ESCs lub ścieżek pozaustrojowej transformacji nowotworowej (kancerogenezy) komórek B-ESCs lub ich zróżnicowanych pochodnych (komórek somatycznych szeregu mezo-, endo- lub ektodermalnego) – przy wykorzystaniu nowoczesnych technik biologii i biotechnologii reprodukcyjnej oraz molekularnej, a także embriologii eks-*

perymentalnej i stosowanej, w ramach technologii wspomaganego rozrodu zwierząt, inżynierii zarodkowej oraz inżynierii komórkowej;

2) określenia szerokiego spektrum predylekcyjnych parametrów molekularnych, obejmujących detekcję biomarkerów transkryptomicznych, proteomicznych, egzosomalnych oraz białkowych wskaźników immunofluorescencyjnych, determinujących:

a) albo stabilne utrzymanie pluripotencji i charakteru macierzystego przez niezróżnicowane komórki B-ESCs;

b) albo zachowanie cech odpowiedzialnych za trwałą (nieodwracalną) cytodyferencjację komórek B-ESCs w kierunku częściowo/nisko lub ostatecznie/wysoko wyspecjalizowanych komórek somatycznych pochodzenia mezo-, endo- i/lub ektodermalnego;

c) albo utrwalenie warunków sprzyjających transformacji onkogennej (neoplastycznej) w kierunku nisko zróżnicowanych/złośliwych lub wysoko zróżnicowanych/niezłośliwych komórek nowotworowych, co pozwala na identyfikację endogennych czynników molekularnych odpowiedzialnych za inicjację i progresję tumorogenezy (nowotworzenia) i metastazy (przerzutowania) w przedstawionych w ramach niniejszej pracy, nowatorskich biomedycznych modelach *in vitro* kancerogenezy człowieka, bazujących na namnożonych *ex ovo* liniach komórek B-ESCs kury domowej, kaczki domowej i gęsi domowej.

Reasumując, najważniejszym atutem i najmocniejszą stroną przedstawionego w tym artykule profilu badawczego ukierunkowanego na opracowanie strategii wyprowadzania, różnicowania czy transformacji neoplastycznej *in vitro* stabilnych linii zarodkowych komórek macierzystych wywodzących się z komórek blastodermalnych wybranych przedstawicieli taksonomicznych ptaków hodowlanych (kura, kaczka, gęś) jest jego 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 wspomaganiej ochrony *ex situ* i restytucji ginących lub wymarłych gatunków i ras ptaków hodowlanych i wolnożyjących.

*Słowa kluczowe: ptaki hodowlane, drób grzebiący, drób wodny, blastodermalno-pochodne zarodkowe komórki macierzyste (B-ESCs), inżynieria hodowli komórkowych, biotechnologia rolnicza i reprodukcyjna, embriologia eksperymentalna i stosowana*

## 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 wspomaganiej ochrony *ex situ* oraz genetycznego ratowania różnych gatunków i ras ptaków hodowlanych, w tym kury domowej (*Gallus gallus domesticus*), kaczki domowej (*Anas platyrhynchos forma domestica* oraz *Cairina moschata f. domestica*) i gęsi domowej (*Anser 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 i zachowaniu pluripotencji 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 i różnicowaniu 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 wybranych gatunków drobiu hodowlanego (kura, kaczka, gęś) stanowią doskonały biorezerwuwar 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 tarczkiowego (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*) kur, kaczek i gęsi (Petitte i in., 1990, 2004; Xiong i in., 2020). Wymierną korzyścią wynikającą z kompleksowego wdrażania rozwiązań z zakresu gatunkowo-specyficznego biotechnologii reprodukcyjnej oraz genetycznej inżynierii embrionalnej opartej na różnych systemach wyprowadzania, kolekcjonowania, pozaustrojowej hodowli oraz różnicowania (cytodiferencjacji) *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, kaczki domowej i gęsi domowej (Samiec i Trzcińska, 2022; Sun i in., 2022).

Biorąc pod uwagę wszystkie wyżej wymienione agrobiotechnologiczne, biologiczne, zootechniczne oraz gatunkowo-specyficzne uwarunkowania ornitologiczne, nadrzędnym celem niniejszej pracy jest przedstawienie i charakterystyka zalet procedur badawczych sprofilowanych na stworzenie modeli *in vitro* dla potrzeb:

- 1) izolacji komórek BCs z zapłodnionych jaj kury domowej, kaczki domowej oraz gęsi domowej;
- 2) wyprowadzania *ex ovo* stabilnych linii komórek ESCs z wyizolowanych subpopulacji komórek BCs;
- 3) hodowli *in vitro* sprzyjającej zachowaniu warunków samoodnawiania i molekularnych cech pluripotencji wyprowadzonych linii komórek ESCs pochodzenia blastodermalnego (B-ESCs);
- 4) cytodiferencjacji *ex ovo* wyprowadzonych i stabilnych mitotycznie linii pluripotentnych komórek B-ESCs w częściowo i/lub terminalnie zróżnicowane komórki somatyczne o odmiennym/zdywersyfikowanym pochodzeniu histologicznym, czyli innymi słowy komórki wywodzące się z różnych listków zarodkowych (mezo-, endo- i/lub ektodermi);
- 5) określenia ilościowych i jakościowych biomarkerów molekularnych (transkryptomicznych i proteomicznych wskaźników, egzosomalnych sygnatur mikroRNA oraz białkowych profili immunofluorescencyjnych z identyfikacją wewnątrzkomórkowej immunolokalizacji), determinujących:
  - a) stabilizację cech pluripotencji i charakteru macierzystego poszczególnych linii komórek B-ESCs; i/lub
  - b) warunkujących trwałą (nieodwracalną) indukcję, tj. inicjację, progresję i terminację, procesów cytodiferencjacji komórek B-ESCs w częściowo lub terminalnie wyspecjalizowane komórki somatyczne o odmiennym pochodzeniu histologicznym; i/lub
  - c) pozwalających na efektywną transformację onkogeną/neoplastyczną w kierunku nisko zróżnicowanych (często złośliwych) lub wysoko zróżnicowanych (z reguły niezłośliwych) komórek nowotworowych, co pozwala na detekcję predylekcyjnych biomarkerów tumorigenezy (nowotworzenia) i metastazy (przerzutowania) w opracowanych w ramach niniejszego zadania badawczego, innowacyjnych biomedycznych modelach *ex vivo* kancerogenezy człowieka, opartych na wyprowadzonych *ex ovo* komórkach B-ESCs ptaków hodowlanych;
- 6) oszacowania zmienności parametrów molekularnych dla pluripotentnych komórek B-ESCs oraz wywodzących się z nich linii zróżnicowanych komórek mezo-, endo- i/lub ektodermal-

nych, w zależności od oddziaływania szerokiego spektrum ektopowych czynników epigenetycznych i/lub ekscytotoksycznych i/lub troficzno-energetycznych i/lub mitogennych (procytokinetycznych) i/lub antymitogennych (cytostatycznych) i/lub karcinogennych (rakotwórczych) i/lub neurodegeneracyjnych i/lub cytoprotekcyjnych i/lub antyoksydacyjnych.

## **Obecny stan badań i wyzwania stojące przed bioinżynierią hodowli zarodkowych komórek macierzystych ptaków hodowlanych**

Pluripotenne 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 ciągu długiego okresu obejmującego ok. 30 lat uzyskano sukcesywne postępy w badaniach nad rozwojem metod hodowli pluripotentnych komórek macierzystych jedynie u kury domowej (*Gallus gallus domesticus*), jednakże progresja tych postępów jest w dalszym ciągu wysoce niewystarczająca. Pozwoliło to w pierwszej kolejności na uzyskanie linii komórkowej 9N2-5 (Pain i in., 1996; Acloque i in., 2001).

Niemniej jednak, biorąc powyższe pod uwagę, niezbędne jest zarówno przyspieszenie prac nad stworzeniem strategii badawczych typu „*game changer*”, pozwalających na znaczącą poprawę wydajności otrzymywania stabilnych – pod względem potencjału proliferacyjnego i cech pluripotencji – blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) kury domowej, jak i optymalizacja uprzednio opracowanych metod wyprowadzania i hodowli namnażających komórki B-ESCs, w wielu przypadkach w większym lub mniejszym stopniu suboptymalnych, a także w niedostatecznym stopniu powtarzalnych pod kątem uzyskiwanej efektywności, nie wspominając już o jakimkolwiek braku postępów w opracowaniu procedur pozwalających na efektywną i trwałą cytodyferencjację *ex ovo* komórek B-ESCs kury domowej, a także o nieistnieniu jakichkolwiek metod poza-jajowego wyprowadzania, namnażania, pluripotentnej stabilizacji czy też różnicowania komórek B-ESCs innych gatunków ptaków, w tym innych niż kura domowa gatunków drobiu hodowlanego. Co więcej, strategię 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 podtrzymywaniu 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 (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-zależny inhibitor ATPaz). Linie fibrobla-

stów STO charakteryzuje jednocześnie wysoka wrażliwość na działanie enzymu HPRT oraz triady HAT, czyli hipoksantyny (zasada azotowa/oksy puryna będąca składnikiem nukleozydu purynowego – inozy), 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 Lavoir i Mather-Love, 2006). Obecnie stosuje się specjalnie dedykowane cytokiny i podłoża hodowlane, aby zachować kurcze komórki ESCs w stanie nieróżnicowanym. Czynniki hamujące 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 egzogennej zasady 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 niezróżnicowanym 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 cytotoksynami i parakrynnymi nie są dokładnie zdefiniowane (van de Lavoir i Mather-Love, 2006). W związku z tym istniało zapotrzebowanie na opracowanie uproszczonych, a jednocześnie optymalnych warunków hodowli w celu utrzymania pluripotencji kurzych komórek ESCs podczas długoterminowej hodowli namnażającej.

Wyniki naszych badań wstępnych sugerują, że opracowane systemy hodowli *ex ovo* komórek B-ESCs kury i kaczki domowej bazujące na takich naczyniach hodowlanych jak: szklane mikropłytki 8-komorowe Ibidi z podłożem powlekanym poli-L-lizyną oraz polistyrenowe szalki z podłożem powlekanym kolagenem typu I (SPL Life Sciences SPL Coat™ Collagen Type I Coated Dishes), a także oparte na medium hodowlanym wzbogaconym o takie suplementy o właściwościach mitogennych oraz energetyczno-troficznych jak: SCF, B-27™ Plus oraz FBS, zapewniają optymalne poza-jajowe środowisko sprzyjające utrzymaniu morfologicznych i ultrastrukturalnych cech fenotypowych kurzych i kaczek komórek zarodkowych o atrybutach znamienych dla komórek macierzystych przez ponad 15 pasaży *in vitro* (Samiec i in., 2023). Okrągły i charakterystyczny dla komórek B-ESCs kształt skupisk komórkowych został potwierdzony poprzez obserwacje morfologiczne. Skupiska komórkowe posiadały kształt sferyczny, ale nie były tak okrągłe i zwarte jak komórki zarodkowe człowieka, myszy lub świni. Komórki B-ESCs obu gatunków drobiu hodowlanego nie odznaczały się również tak wyraźnymi granicami jak zarodkowe komórki macierzyste myszy (mESCs) i zarodkowe komórki macierzyste człowieka (hESCs). Embrionalne komórki macierzyste kury domowej lub kaczki 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 (Samiec i in., 2023). W ramach tego panelu prac badawczych utworzono w Zakładzie Biotechnologii Rozrodu i Kriokonserwacji IZ-PIB biorepozytoria dedykowane

komórkom B-ESCs obu wyżej wymienionych gatunków drobiu hodowlanego. Specyfikację tych biorepozytoriów przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1. Biorepozytoria w postaci zabezpieczonych *ex ovo* zarodkowych komórek macierzystych wyizolowanych z zapłodnionych *in vivo* jaj ptaków hodowlanych

Table 1. The biorepositories involving *ex ovo* protected embryonic stem cells isolated from *in vivo*-fertilized eggs of breeding birds

Gatunek Species	Pochodzenie komórek macierzystych The provenance of stem cells	Metoda konservacji Method of conservation	Liczba linii komórkowych Number of cell lines	Liczba zapłodnionych jaj Number of fertilized eggs
Kura domowa Domestic chicken ( <i>Gallus gallus domesticus</i> )	B-ESCs	Kriokonserwacja Cryoconservation	18	90
Kaczka domowa Domestic duck ( <i>Anas platyrhynchos forma domestica</i> ; <i>Cairina moschata f. domestica</i> )			28	140

B-ESCs – blastodermalno-pochodne zarodkowe komórki macierzyste (ang. blastoderm-derived embryonic stem cells).

## Docelowe kierunki potencjalnego zastosowania bioinżynierii zarodkowych komórek macierzystych wywodzących się z blastodermy jaj ptaków hodowlanych

Badania z zakresu inżynierii hodowli blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych (B-ESCs) charakteryzują się szerokim potencjałem aplikacyjnym, który może znaleźć odzwierciedlenie w opracowaniu zupełnie nowych procedur badawczych ukierunkowanych na stworzenie innowacyjnych modeli *in vitro* wyprowadzania komórek B-ESCs wybranych gatunków drobiu hodowlanego (kura, kaczka, gęś) na potrzeby:

- 1) określenia warunków fizyko-chemicznych i biologicznych: izolacji, adhezji, proliferacji, zewnątrzkomórkowej stabilizacji fenotypowych cech pluripotencji oraz systemów różnicowania (cytotyferencjacji) *ex ovo* komórek B-ESCs lub ścieżek pozaustrojowej transformacji nowotworowej (kancerogenezy) komórek B-ESCs lub ich zróżnicowanych pochodnych (komórek somatycznych szeregu mezo-, endo- lub ektodermalnego) – przy wykorzystaniu nowoczesnych technik biologii i biotechnologii reprodukcyjnej oraz molekularnej, a także embriologii eksperymentalnej i stosowanej, w ramach technologii wspomaganego rozrodu zwierząt, inżynierii zarodkowej oraz inżynierii komórkowej;
- 2) określenia szerokiego spektrum predylekcyjnych parametrów molekularnych, obejmujących detekcję biomarkerów transkryptomicznych, proteomicznych, egzosomalnych, oraz białkowych wskaźników immunofluorescencyjnych, determinujących:
  - a) albo stabilne utrzymanie pluripotencji i charakteru macierzystego przez nie zróżnicowane komórki B-ESCs;

b) albo zachowanie cech odpowiedzialnych za trwałą (nieodwracalną) cytodyferencjację komórek B-ESCs w kierunku częściowo/nisko lub ostatecznie/wysoko wyspecjalizowanych komórek somatycznych pochodzenia mezo-, endo- i/lub ektodermalnego;

c) albo utrwalenie warunków sprzyjających transformacji onkogennej (neoplastycznej) w kierunku nisko zróżnicowanych/złośliwych lub wysoko zróżnicowanych/niezłośliwych komórek nowotworowych, co pozwala na identyfikację endogennych czynników molekularnych odpowiedzialnych za inicjację i progresję tumorigenezy (nowotworzenia) i metastazy (przerzutowania) w opracowanych w ramach niniejszego zadania badawczego, absolutnie nowatorskich biomedycznych modelach *in vitro* kancerogenezy człowieka, bazujących na namnożonych *ex ovo* liniach komórek B-ESCs kury domowej i/lub kaczki domowej i/lub gęsi domowej.

Podsumowując, zasadniczym wyzwaniem naukowo-badawczym dla przyszłych badań z zakresu ornitologicznej embriologii eksperymentalnej i stosowanej oraz biotechnologii reprodukcyjnej hodowlanego drobiu grzebiącego i wodnego będzie opracowanie efektywnych systemów wyprowadzania oraz hodowli proliferacyjnej, gwarantujących stabilizację fenotypowych cech pluripotencji zarodkowych komórek macierzystych wybranych gatunków ptaków hodowlanych (kura, kaczka, gęś) w warunkach *ex ovo*. Należy podkreślić nowatorski kierunek badawczo-rozwojowy tego profilu działań badawczych z uwagi na fakt, że według naszej najlepszej wiedzy nie były dotąd prowadzone takie prace naukowo-badawcze jak: 1) badania ukierunkowane na stworzenie modeli *ex ovo* różnicowania komórek B-ESCs kury domowej w kierunku wysoko wyspecjalizowanych komórek somatycznych pochodzenia mezo-, endo- i/lub ektodermalnego; 2) badania w kierunku stworzenia modeli *ex vivo* wyprowadzania i hodowli namnażających niezróżnicowanych komórek B-ESCs o właściwościach pluripotentnych u udomowionych przedstawicieli taksonomicznych drobiu wodnego (kaczki, gęsi); a także 3) badania w kierunku filogenetycznej charakterystyki porównawczej molekularnych atrybutów dla ścieżek pozajajowego zachowania fenotypowych cech pluripotencji oraz dla ścieżek pozajajowej indukcji pro-mezodermalnej, pro-endodermalnej lub proektodermalnej cytodyferencjacji pierwotnych komórek zarodkowych między różnymi gatunkami ptaków, w tym także między ich udomowionymi taksonami reprezentowanymi przez kurę domową, kaczkę domową i gęś domową.

Finalnie, najważniejszym atutem i najmocniejszą stroną zaprezentowanych w niniejszym artykule zagadnień badawczych, ukierunkowanych na opracowanie strategii wyprowadzania, różnicowania czy transformacji neoplastycznej *in vitro* stabilnych linii zarodkowych komórek macierzystych (pierwotnych komórek zarodkowych) wywodzących się z komórek blastodermalnych wybranych przedstawicieli taksonomicznych ptaków hodowlanych (kura, kaczka, gęś) 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 wspomaganiej 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 Trzcńska, 2022; Samiec i in., 2023).

## 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., 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.
- 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.
- 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 chimaeras from embryo-derived. *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.
- 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.
- 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.
- Lavoir van de M.C., Mather-Love C. (2006). Avian embryonic stem cells. *Methods Enzymol.*, 418: 38–64.
- 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. *Mechanisms of 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 B.B., 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., Trzcińska 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.
- Samiec M., Trzcińska M., Połowicz K., Duda M. (2023). Opracowanie efektywnej strategii wyprowadzania stabilnych mitotycznie linii blastodermalno-pochodnych zarodkowych komórek macierzystych z zapłodnionych jaj kury domowej (*Gallus gallus domesticus*) – 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*). *Rocz. Nauk. Zoot.*, 50: 249–268.
- 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.
- 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. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 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.
- 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.*, 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.*: 2157451.

Zatwierdzono do druku: 8 IV 2024

## **BIOENGINEERING BASED ON EMBRYONIC STEM CELLS OF SELECTED SPECIES OF BREEDING POULTRY – SCIENTIFIC, RESEARCH AND APPLICATION POTENTIAL**

**Marcin Samiec, Monika Trzcńska**

### **SUMMARY**

At the current stage of investigations, it is indispensable both to accelerate the elaboration of “game changer” research strategies, enabling a significant improvement in the efficiency of generating stable – in the context of proliferative potential and pluripotency-related attributes – blastoderm-derived embryonic stem cells (B-ESCs) of the domestic fowl, and to optimize previously developed methods intended for establishment and *in vitro* expansion of B-ESCs (in many cases more or less suboptimal), and insufficiently replicable in terms of the efficiency obtained. It is also necessary to note the lack of any progress in the development of procedures allowing for efficient and sustainable *ex ovo* cytodifferentiation of chicken B-ESCs, as well as the non-existence of any methods for extra-ovum derivation, multiplication, pluripotent stabilization or differentiation of B-ESCs in other avian species, including breeding poultry species other than the domestic chicken. Within the framework of the present work, efforts will be unveiled to develop completely new research procedures aimed at creating innovative *in vitro* models for establishing B-ESCs of selected species of breeding poultry (domestic chicken, duck, goose) for the purposes of:

- 1) recognizing the physico-chemical and biological conditions of isolation, adhesion, proliferation, extracellular stabilization of phenotypic traits of pluripotency and systems applied to *ex ovo* cytodifferentiation of B-ESCs or pathways of extracorporeal neoplastic transformation (carcinogenesis) of B-ESCs or their differentiated derivatives (somatic cells of meso-, endo- or ectodermal origins) – by using modern techniques of not only reproductive and molecular biology/biotechnology, but also experimental and applied embryology, within the framework of assisted animal reproductive technologies, and embryonic cell engineering;
- 2) unravelling a broad spectrum of predictive molecular parameters, including the detection of transcriptomic, proteomic, exosomal biomarkers, and protein immunofluorescence indicators that determine:
  - (a) either the stable maintenance of pluripotency and stemness by undifferentiated B-ESCs;
  - (b) or the preservation of the attributes responsible for the permanent (irreversible) cytodifferentiation of B-ESCs into partially/lowly or terminally/highly specialized somatic cells of meso-, endo- and/or ectodermal provenance;
  - (c) or perpetuation of conditions conducive to oncogenic (neoplastic) transformation toward low-differentiated/malignant or highly-differentiated/non-malignant tumor cells, which gives the possibility to identify endogenous molecular factors responsible for the initiation and pro-

gression of tumorigenesis and metastasis in the novel *in vitro* biomedical models of human carcinogenesis deciphered within the framework of this research work, based on the *ex ovo* expanded B-ESC lines of domestic chicken, domestic duck and domestic goose.

To sum up, the most important advantage and the strongest point of the research profile presented in this article targeted at the elaboration of strategic approaches to establishment, differentiation, or *in vitro* neoplastic transformation of mitotically stable B-ESC lines in the selected taxonomic representatives of farmed birds (chicken, duck, goose) is its pioneering and innovative character, which provides a solid program basis for the implementation and success of the assumptions of further, more advanced research and development work in the field of: 1) agricultural and reproductive biotechnology, and 2) interdisciplinary research at the interface of biomedicine, transgenics, molecular biology and biotechnology, as well as 3) biotechnologically- and embryologically-assisted *ex situ* conservation and restoration of disappearing or extinct species and breeds of domesticated and wild birds.

**Keywords:** breeding birds, landfowl, waterfowl, blastoderm-derived embryonic stem cells (B-ESCs), cell culture engineering, agricultural and reproductive biotechnology, experimental and applied embryology