

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J. J. Śniadeckich w

Bydgoszczy

Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt

Katedra Biochemii i Biotechnologii Zwierząt

Tytuł:

*Zachowanie się pierwotnych komórek płciowych kury,
wprowadzonych do naczyń krwionośnych zarodka
biorcy*

***Behavior of chicken primordial germ cells injected into the
bloodstream of recipient embryo***

Izabela Kozłowska

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem:

Prof. dr hab. Marka Bednarczyka

Promotor pomocniczy :

Dr inż. Paweł Łakota

*Serdecznie dziękuję mojemu Promotorowi,
Prof. dr hab. Markowi Bednarczykowi za opiekę
naukową, życzliwość, poświęcony mi czas, a także za
wsparcie i wyrozumiałość. Dziękuję również dr inż.
Pawłowi Łakocie za cenne wsparcie merytoryczne i
wszechstronną pomoc.*

*Dziękuję także całemu zespołowi z Katedry
Biochemii i Biotechnologii Zwierząt za uśmiech,
wsparcie i pomoc przez wszystkie cztery lata.*

SPIS TREŚCI

strona

SPIS SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY	7
1. WSTĘP	8
1.1. WPROWADZENIE	8
1.2. ZASTOSOWANIE TRANSGENICZNYCH KUR	8
1.3. METODY PRODUKCJI TRANSGENICZNYCH KUR.....	10
1.4. PIERWOTNE KOMÓRKI PŁCIOWE JAKO NARZĘDZIE W TWORZENIU TRANSGENICZNYCH KUR.....	14
1.5. MORFOLOGICZNA I BIOLOGICZNA CHARAKTERYSTYKA PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH	15
1.6. METODY IZOLACJI PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH.....	17
1.7. DOBÓR GENOTYPU DAWCY I BIORCY PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH	19
1.8. METODY STERYLIZACJI ZARODKÓW BIORCÓW.....	21
1.9. CEL PRACY	22
 2. MATERIAŁ I METODY	23
2.1. PLAN BADAŃ	23
2.2. MATERIAŁY UŻYTE W PRACY	24
2.3. OPTIMALIZACJA SPOSOBU IZOLACJI PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH Z GONAD 6-DNIOWYCH ZARODKÓW KURZYCH.....	25
2.4. BADANIE WPLYWU DAWCY I BIORCY KOMÓREK NA DETEKCJĘ EGZOGENNYCH PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH W GONADACH ZARODKÓW BIORCÓW	27
2.5. METODA STERYLIZACJI ZARODKÓW BIORCÓW I JEJ WPLYW NA ICH PRZEŻYWALNOŚĆ I ROZWÓJ.....	31
2.6. ANALIZA STATYSTYCZNA	37

3. WYNIKI	38
3.1. OPTYMALIZACJA SPOSOBU IZOLACJI PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH Z GONAD 6-DNIOWYCH ZARODKÓW KURZYCH.....	38
3.2. BADANIE WPŁYWU DAWCY I BIORCY KOMÓREK, NA DETEKCJĘ EGZOGENNYCH PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH W GONADACH ZARODKÓW BIORCÓW	41
3.3. METODA STERYLIZACJI ZARODKÓW BIORCÓW, POPRZEDZAJĄCA INIEKCJĘ PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH I JEJ WPŁYW NA PRZEŻYWALNOŚĆ ZARODKÓW BIORCÓW	46
 4. DYSKUSJA	 61
4.1. OPTYMALIZACJA SPOSOBU IZOLACJI PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH Z GONAD 6-DNIOWYCH ZARODKÓW KURZYCH.....	62
4.2. BADANIE WPŁYWU DAWCY I BIORCY KOMÓREK, NA DETEKCJĘ EGZOGENNYCH PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH W GONADACH ZARODKÓW BIORCÓW	65
4.3. METODA STERYLIZACJI ZARODKÓW BIORCÓW, POPRZEDZAJĄCA INIEKCJĘ EGZOGENNYCH PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH I JEJ WPŁYW NA PRZEŻYWALNOŚĆ I ROZWÓJ ZARODKÓW BIORCÓW	72
 5. WNIOSKI	 77
6. TABELI ILLUSTRACJI	78
7. LITERATURA	90

SPIS SKRÓTÓW UŻYTYCH W PRACY

PGCs - *Primordial Germ Cells* - pierwotne komórki płciowe

E-G&K - Eyal-Giladi i Kohav (1976)

H&H - Hamburger i Hamilton (1951)

rpm - revolutions per minute - obroty na minutę

PGCs^{PKH26[-]} - pierwotne komórki płciowe niewyznakowane fluorochromem PKH26

PGCs^{PKH26[+]} - pierwotne komórki płciowe wyznakowane fluorochromem PKH26

ZK - zielononóżka kuropatwana

R - Ross 308

I - iniekcja treosulfanu pod tarczkę zarodkową

II - iniekcja treosulfanu do kuli żółtkowej

PBS - *Phosphate Buffered Saline* - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej

PBS[-] - zbuforowany roztwór soli fizjologicznej bez jonów wapnia (Ca^{2+}) i magnezu (Mg^{2+})

PAS - *Peridic Acid Solution* - kwas paraaminosalicylowy

FBS - *Fetal Bovine Serum* - bydlęca surowica płciowa

Pen-Strep - *Penicillin Streptomycin* - antybiotyk penicylina i streptomycyna

OPTI-MEM® I - OPTI-MEM I Reduced Serum Medium - zredukowane medium bez surowicy

PKH26 - *Paul Karl Horan 26 fluorescent dye* - fluorochrom zawierający żółtopomarańczowy barwnik fluorescencyjny

TREO - cytostatyk treosulfan

1. WSTĘP

1.1. WPROWADZENIE

Pierwotne komórki płciowe (ang. primordial germ cells - PGCs) są jedynymi komórkami zdolnymi do przekazywania informacji zapisanej w materiale genetycznym, z pokolenia na pokolenie. PGCs mogą być izolowane, hodowane *in vitro* i genetycznie modyfikowane z zachowaniem potencjału tworzenia linii płciowych (van de Lavoie i wsp., 2006). Wykazano, że PGCs mogą być przenoszone z jednego zarodka do drugiego i tworzyć funkcjonalne komórki płciowe w zarodku biorcy (Sang, 2009). Zjawisko to zostało wykorzystane w produkcji ptaków transgenicznych za pośrednictwem chimer płciowych, a dodatkowe modyfikacje genetyczne kurzych PGCs mogą wpłynąć na efektywność produkcji drobiarskiej, a nawet oferować doskonałe narzędzie do produkcji ludzkich białek terapeutycznych (Park i Han, 2012a).

Głównym celem badań nad chimerami i ptakami transgenicznymi jest stworzenie zarodka składającego się z komórek posiadających i wykazujących ekspresję transgenu oraz komórek zapewniających prawidłowy rozwój zarodka (Ishii i wsp., 2004), toteż prowadzone na świecie badania nad tworzeniem transgenicznych zwierząt rozwijają się w dwóch zasadniczych kierunkach: i) wydajnej manipulacji jak największą liczbą różnych typów komórek z zachowaniem ich wysokiej przeżywalności oraz ii) modyfikowania określonych egzogenów bez ingerencji w pozostałe geny zwierzęcia (Han, 2009). W związku z powyższym wiele prac skupia się nad opracowaniem technik pozyskiwania PGCs, utrzymywania ich wysokiej żywotności i optymalizacji systemów uzyskiwania chimer płciowych (drogą iniekcji PGCs) o wysokim potencjale transmisji zarodkowej. Jednym z najważniejszych czynników determinujących efektywność uzyskiwania chimer, czy też transgenicznego potomstwa, jest procent wprowadzonych PGCs do całkowitej populacji endogennych PGCs w gonadach biorców (Li i Lu, 2010). Stosunek ten można modyfikować przez eliminację endogennych PGCs należących do zarodków biorców oraz jednocześnie zwiększenie liczby i potencjału integracyjnego wprowadzanych egzogennych PGCs.

W niniejszej pracy przedstawiono zachowanie się PGCs izolowanych z gonad zarodków dawców i wprowadzonych do zarodków pełniących funkcję biorców. Hipoteza badawcza zakłada, że możliwe jest zwiększenie liczby wprowadzonych i zintegrowanych z organizmem biorcy PGCs poprzez opracowanie odpowiedniej metody ich izolacji, dobór genotypów dawcy – biorców komórek, oraz ograniczenie populacji endogennych PGCs biorców.

1.2. ZASTOSOWANIE TRANSGENICZNYCH KUR

Kura domowa (*Gallus gallus domesticus*) stała się ważnym obiektem badań biotechnologicznych, w szczególności zajmujących się transgenezą.

Powodem dla którego ptaki są coraz częściej poddawane manipulacjom genetycznym jest swobodny dostęp do zarodków oraz łatwość przeprowadzania na nich zabiegów mikrochirurgicznych (Ishii i wsp., 2004). Jedną z najważniejszych grup badań transgenicznych u drobiu jest wdrożenie modelu kury do produkcji bioterapeutyków (Rashidi i Sottile, 2009; Song i Han, 2011). Te drogie i skomplikowane w produkcji leki są ważnym elementem wielu terapii m.in. nowotworowych, leczenia stwardnienia rozsianego, wirusowego zapalenia wątroby typu C, chorób autoimmunologicznych oraz wielu innych. Oprócz ptaków, do produkcji bioterapeutyków wykorzystuje się także ssaki, np.: krowy, owce, kozy, a nawet króliki (Sang, 2003). W porównaniu do transgenicznych ssaków, ptasie bioreaktory posiadają takie zalety jak krótki cykl rozrodczy, mały odstęp między pokoleniami, dużą wydajność nieśną, łatwy do prowadzenia odchów (Li i Lu, 2010), obecność inhibitorów proteazy w jajach (Rapp i wsp., 2003), wzór glikozylacji protein zbliżony do ludzkiego oraz możliwość wytwarzania w jajowodzie i deponowaniu w jajach toksycznych dla ssaków białek (Lillico i wsp., 2005). Również pozycja filogenetyczna i zwarta struktura genomu kurcząt sprawiają, iż ptaki są łatwiejszym obiektem badań niż ssaki (Han, 2009). Zalety te sprawiają, że koszty wytwarzania bioterapeutyku w jajach są znacznie mniejsze od tego produkowanego w gruczołach mlekowych. Wysoka zawartość albumin w jajach sprawia, że ilość wygenerowanego białka terapeutycznego może sięgać nawet kilkuset miligramów (Ivarie, 2006). Za sprawą bioreaktorów kurzych otrzymano, m.in. ludzką erytropoetynę (Koo i wsp., 2010), interferon alfa 2b (Rapp i wsp., 2003), interferon beta 1a (Lillico i wsp., 2007), przeciwciała monoklonalne (Kamihira i wsp., 2005), czynnik stymulujący tworzenie kolonii granulocytów (ang. G-CSF) (Kwon i wsp., 2008), parathormon (Lee i wsp., 2007), itd.

Spekuluje się że, oprócz tworzenia kurzych bioreaktorów, manipulacje genetyczne u ptaków mogą być stosowane w celu zwiększenia ilości i poprawy jakości produktów drobiarskich, takich jak mięso i jaja. Ingerencje genetyczne w szlaki biosyntezy doprowadzić mogą do zmian w wykorzystaniu paszy, tempie wzrostu, w składzie i masie ciała (Cyriac i wsp., 2012). Na przykład wywołanie wzmożonej ekspresji czynników wzrostowych skutkować będzie szybszym tempem wzrostu ptaków. Z kolei, ograniczenie ekspresji miostatyny może doprowadzić do wzmożonego wzrostu mięśni przy spadku zawartości tłuszczu oraz wpłynąć na lepszą jakość mięsa (Sang, 2003).

Transgeniczne technologie w produkcji drobiarskiej znalazły także zastosowanie przy zwiększeniu czy też wywołaniu odporności ptaków na niektóre choroby wirusowe. Stąd, jednym z głównych celów programów genetycznych w produkcji drobiarskiej jest identyfikacja genów naturalnej odporności lub genów, które mogą ją wzmocnić. Narzędziami pozwalającymi uzyskać taki efekt są międzygatunkowe i międzyrasowe transfery egzogenów, a także modyfikacje i wzmacnianie ekspresji genów odporności (Sławińska i in., 2014). Zablokowano już między innymi replikację wirusów ptasiej grypy, poprzez bezpośrednie unieczynnienie genów wirusowych krótkimi fragmentami

RNA kodowanymi przez sztucznie wprowadzone geny (Ge i wsp., 2003). Ponadto na podstawie badań *in vitro* przypuszcza się, iż uzyskany metodami transgenicznymi drób, także w sposób pośredni może skutecznie hamować infekcje wywołane przez wirusa zakaźnego zapalenia torby Fabrycjusza, poprzez produkcję wcześniej niewytwarzanych białek (Sang, 2009).

Modyfikacje genetyczne mogą także znaleźć zastosowanie w ograniczeniu negatywnego wpływu produkcji drobiarskiej na stan środowiska. Transgeniczne dodanie fitazy do puli enzymów trawiennych kur może rozwiązać problem zanieczyszczenia środowiska fosforem, poprzez wymuszenie jego rozkładu w organizmie zwierzęcia (Sang, 2003).

Ważnym elementem jest także wykorzystanie modelu kury w badaniach nad biologią rozwoju (Rashidi i Sottile, 2009). Łatwy dostęp do rozwijającego się embriona kurzego sprawia, iż z powodzeniem można przeprowadzać na nim różnego rodzaju manipulacje, co w przypadku ssaków jest znacznie utrudnione (Mozdziak i Petite, 2004). Ponadto zachowanie potencjału kurzych PGCs do tworzenia linii płciowych, nawet po długim czasie hodowli *in vitro* oraz po przeprowadzonych na nich manipulacjach genetycznych, w połączeniu ze zdolnością do nabywania przez nie cech somatycznych sprawia, iż komórki te z powodzeniem mogą zostać nowym modelem w badaniach nad biologią rozwoju (van de Lavoie i wsp., 2006). Na korzyść tego modelu przemawia wspomniana wcześniej łatwość dostępu do zarodka i możliwość ponownego wprowadzenia PGCs do krwiobiegu embriona we wczesnych etapach jego rozwoju. Powyższe atuty tworzą nowe możliwości manipulacji kurzym genomem dając perspektywę wdrożenia wyników w rolnictwie i przemyśle farmaceutycznym (Mahdi i Fariba, 2012).

1.3. METODY PRODUKCJI TRANSGENICZNYCH KUR

Kurczęta transgeniczne można produkować na kilka sposobów poprzez wprowadzenie transgeny do komórek, które dają początek komórkom płciowym (oocytom i plemnikom), komórek wchodzących w skład zapłodnionego jaja, czy też zarodka we wczesnym etapie jego rozwoju. Również różne stadia rozwoju komórek płciowych oraz ich prekursorów dają kolejne możliwości do bezpośredniej interwencji w genom gospodarza. Obecnie, zakłada się istnienie dwóch głównych sposobów produkcji transgenicznych kurcząt, ze względu na docelowe miejsce deponowania transgeny. Są to: i) bezpośrednia modyfikacja zarodka z wykorzystaniem DNA lub wektorów wirusowych oraz ii) pośrednie działania na komórkach blastodermalnych, macierzystych komórkach embrionalnych, pierwotnych komórkach płciowych oraz macierzystych komórkach spermatogoniów (Li i Lu, 2010). Bardziej szczegółowe sposoby wytwarzania genetycznie zmodyfikowanych ptaków zostały przedstawione w tabeli 1.

Tab. 1. Metody stosowane w produkcji transgenicznych kurcząt (modyfikacja Cyriac i wsp., 2012).

metoda	opis
transfer genu za pośrednictwem wirusów	- wektory retro- i lentiwirusowe - najbardziej wydajna metoda - wykorzystuje naturalne zdolności wirusa do łączenia własnego materiału genetycznego z DNA gospodarza - transfekcja BCs, PGCs, komórek jądrowych
mikroiniekcja DNA	- wprowadzenie obcego DNA do przedjądra świeżo zapłodnionego jaja - znikome zastosowanie ze względu na trudność zabiegu - niska wydajność
transfer genu za pośrednictwem macierzystych komórek embrionalnych, pierwotnych komórek płciowych i komórek blastodermalnych	- wymaga pozyskania komórek (ESCs, PGCs, BCs) - komórki są utrzymywane w warunkach <i>in vitro</i> zabezpieczających je przed różnicowaniem się - wprowadzenie egzogenu przez lipofekcję, elektroporację, nukleofekcję - zmodyfikowane komórki wymagają powtórnego wprowadzenia do zarodka
transfer jądrowy	- transfer jądra do enukleowanej komórki - niewielka wydajność - znaczne ograniczenie zastosowania metody w przypadku drobiu ze względu na obecność żółtka i utrudnionego dostępu do jednokomórkowego zarodka
sztuczne chromosomy	- mogą przenosić bardzo duże fragmenty DNA (1Mb lub więcej) - znikome zastosowanie u kurcząt
transfer genu za pośrednictwem jąder	- egzogenne DNA wraz z lipofektantem jest iniekowane bezpośrednio do jąder - egzogeny łączą się z DNA spermatogonii lub plemników, które są następnie wykorzystywane do sztucznej inseminacji - niewielka efektywność u kurcząt
transfer genu za pośrednictwem nasienia	- wykorzystuje zdolności nasienia do wiązania i internalizowania obcego DNA i do przenoszenia go do oocyty podczas sztucznego zapłodnienia - plemniki poddawane są transfekcji metodą: elektroporacji, lipofekcji, REMI itp.

Większość metod produkcji transgenicznych kur, polega na wprowadzeniu uprzednio zaprojektowanych, "nowych" genów do komórek, które dadzą początek komórkom płciowym. W związku z tym, większość tych technik skutkuje wytworzeniem kury (lub koguta) wykazującej mozaikową obecność transgenu w komórkach gonad. Dopiero po skrzyżowaniu chimer można uzyskać potomstwo wykazujące obecność transgenu we wszystkich komórkach ciała. Dlatego też odpowiednie zmodyfikowanie i ukierunkowanie komórek dających początek linii płciowej jest niezbędne do powodzenia eksperymentu (Mozdziak i Petite, 2004).

Do najbardziej wydajnych technik produkcji transgenicznych kur należy transfer egzogenów za pomocą wirusów (Petite i Mozdziak, 2007; Nishijima i Iijima, 2013). Obserwowano, iż sto procent wyklutych piskląt, poddanych transfekcji tą metodą wykazywało obecność i ekspresję introdukowanego genu (Koo i wsp., 2004; Kwon i wsp., 2004; Koo i wsp., 2006; Lee i wsp., 2007; Kwon i wsp., 2008; McGrew i wsp., 2010). Jednak ze względów technicznych oraz bezpieczeństwa zastosowanie wirusów na potrzeby rolnictwa jest ograniczone, toteż opracowano inne, niewirusowe metody efektywnej transfekcji komórek i produkcji transgenicznych kur, za pomocą chimer płciowych (Han i wsp., 1994). Wiele z tych metod wykorzystuje pierwotne komórki płciowe jako wektor transgenu. Uważa się, iż najbardziej bezpieczną, skuteczną i obiecującą metodą jest uzyskanie kurcząt transgenicznych poprzez transfer do zarodków biopcy, PGCs genetycznie modyfikowanych z użyciem metod elektroporacji i/lub lipofekcji. Mimo bezpieczeństwa metody niewirusowe mają jednak pewne mankamenty, których eliminacja jest głównym celem badań nad kurczętami modyfikowanymi genetycznie. Na podstawie piśmiennictwa (146 pozycji) zgromadzonego w bazie Web of Science, przeprowadzono analizę pozwalającą na zestawienie mankamentów i niedoskonałości każdej z dwóch podstawowych metod: wirusowej i niewirusowej, jej wyniki zebrano syntetycznie w tabeli 2.

Tab. 2. Problemy w produkcji transgenicznych kurcząt.

metody produkcji transgenicznych kur	problemy	autorzy
niewirusowe	trudny w kontrolowaniu proces różnicowania się PGCs, BCs lub komórek pochodzenia jądrowego w długoterminowych hodowlach <i>in vitro</i>	Heo i wsp., (2011)
	bardzo niewielka liczba PGCs izolowana z gonad, a w szczególności z krwi zarodkowej	Chang i wsp., (1997)
	bardzo niska wydajność integracji egzogenego DNA z genomem gospodarza przez lipofekcję	Nishijima and Iijima, (2013)
	trudne w izolacji macierzyste komórki zarodka bądź komórki rozrodcze	Li i Lu (2010)

	iniekcja transgenów bądź transfer nuklearny w początkowej fazie rozwoju zarodka jest trudna ze względu na kruchość jaja i delikatność błon żółtka	Lillico i wsp., (2005)
	osiągnięcie zadowalającej wylęgowości piskląt; bezpośrednie wprowadzenie egzogenu do zapłodnionego jaja kurzego jest trudne ze względu na mnogość komórek wchodzących w skład tarczki zarodkowej; trudność w wygenerowaniu pokolenia F1 ze względu na mozaikową ekspresję transgenu w pokoleniu F0; transgeniczne linie uzyskuje się dopiero po roku	Mozdziak i Petite,(2004)
	ekspresja transgenu może nastąpić także w innych komórkach	Mahdi i Fariba, (2012)
	jajo kurze w przeciwieństwie do oocytów ssaczy nie jest przezroczyste co stwarza trudności w mikromanipulacji i mikroiniekcji	Petitte i Mozdziak, (2007)
wirusowe	rozmiar introdukowanego transgenu przy wykorzystaniu wektorów wirusowych jest ograniczony do ok 10 kb; wymagany jest dobór promotorów tkankowo specyficznych oraz wykazujących dużą aktywność	Byun i wsp., (2011)
	wysoka podatność na wyciszenie transgenu wykorzystanie wektorów wirusowych w przypadku ptaków jest ograniczone; ryzyko rekombinacji z retrowirusami powszechnymi w stadach drobiu	Esmaeilzadeh i Farhadi,(2011)
	wirusowa technika transdukcji charakteryzuje się niskim i zmiennym poziomem transmisji linii płciowej oraz niewielką ilością wytwarzanych transgenicznych kurcząt	Park i Han, (2012b)
	ekspresja docelowych egzogenów transportowanych na nośnikach wirusowych może zmieniać się w zależności od rodzaju tkanki i fazy cyklu rozwojowego	Song i Han, (2011)
	transgeny przenoszone przez retrowirusy mogą być wbudowane komórki wykazujące dużą aktywność do dzielenia się, a specyficzne komórki docelowe muszą zostać prawidłowo rozpoznane; możliwa niepożądana integracja retrowirusów w bezpośrednim sąsiedztwie potencjalnych onkogenów - aktywacja procesów nowotworzenia	Li and Lu, (2010)
	wyciszenie transgenu w następnych pokoleniach	McGrew i wsp., (2004)

Obserwacje własne potwierdzają powyższe. Ponadto, w odniesieniu do PGCs, największy problem w produkcji kurcząt chimer do badań transgenicznych metodą izolacji i iniekcji PGCs stanowią: mała liczba izolowanych z gonad i wolnych od agregatów PGCs, niska przeżywalność wyizolowanych komórek w krótkoterminowej hodowli *in vitro*, mała liczba egzogennych PGCs zintegrowanych z zarodkami biorców, niska przeżywalność zarodków biorców po mikroiniekcji komórek, niewielki procent uzyskanych chimer płciowych, a także obecność endogennych PGCs utrudniająca zagnieżdżenie się wprowadzanych komórek w gonadach zarodków biorców. W celu zniwelowania powyższych kwestii należy usprawnić sposoby izolacji PGCs z gonad w kierunku dużej ich liczebności i przeżywalności, zoptymalizować selekcję dawców i biorców PGCs pod kątem niskiej zamieralności zarodków biorców i wysokiego udziału chimer posiadających egzogenne PGCs oraz zminimalizować udział endogennych PGCs w gonadach zarodków biorców poprzez ich sterylizację.

1.4. PIERWOTNE KOMÓRKI PŁCIOWE JAKO NARZĘDZIE W TWORZENIU TRANSGENICZNYCH KUR

Pierwotne komórki płciowe są coraz częściej wykorzystywane w badaniach nad tworzeniem transgenicznych ptaków. Ich modyfikacja genetyczna przebiega zarówno z wykorzystaniem wirusów (Shin i wsp., 2008; Kim i wsp., 2010; Mottono i wsp., 2010) jak i przy pomocy technik niewirusowych (Naito i wsp., 1998; van de Lavoie i wsp., 2006; Macdonald i wsp., 2012; Park i Han, 2012a; Glover i wsp., 2013; Tyack i wsp., 2013; Jordan i wsp., 2014; Chojnacka-Puchta i wsp., 2015), jednakże preferowane są te drugie, szczególnie jeżeli chodzi o zastosowanie w praktycznych programach hodowlanych drobiu.

Wcześniejsze badania wykazały, że wyizolowane kurze PGCs mogą z powodzeniem zostać wprowadzone do zarodków biorców w stadium 12-18 (wg H&H), gdzie swobodnie krążą one we krwi rozwijającego się embriona bez utraty zdolności do przekształcania się w komórki płciowe w późniejszych etapach rozwoju (Naito i wsp., 1998; Naito i wsp., 1999; Kim i wsp., 2004; Mozdziak i wsp., 2006; Macdonald i wsp., 2012; Park i Han, 2012a i 2012b; Sawicka i wsp., 2015). Ta unikalna właściwość stwarza możliwości zastosowania PGCs w produkcji chimer płciowych, a następnie kurcząt transgenicznych.

Dużą zaletą PGCs jest to, iż mogą one być hodowane i modyfikowane w warunkach *in vitro* (Kuwana i wsp., 1996), dlatego też, metoda produkcji transgenicznych kurcząt z wykorzystaniem PGCs wydaje się być szczególnie atrakcyjna, gdyż integracja i ekspresja transgenu może zostać skontrolowana jeszcze przed wprowadzeniem do genomu zarodka biorców (Mozdziak i Petitte, 2004). Dzięki takiemu rozwiązaniu liczba ptaków, z których wybiera się tylko transgeniczne, ulega redukcji oraz zmniejsza się czas potrzebny na ocenę

fenotypu. Ponadto, zwiększa się prawdopodobieństwo, iż uzyskane transgeniczne zwierzęta posiadać będą ukierunkowane zmiany w obrębie własnego genomu. Posługując się PGCs oczekuje się przede wszystkim zwiększonej wydajności transmisji egzogenu na potomstwo, gdyż komórki te są prekursorami jaj i plemników (Li i Lu, 2010). Wymagane są jednak dalsze badania optymalizujące wytwarzanie transgenicznych ptaków, uwzględniające między innymi bardziej szczegółowe ekspertyzy zachowania się egzogennych PGCs w zarodkach biorcach, zwiększenie ilości izolowanych PGCs oraz optymalizacja doboru genotypów dawcy i biorcy PGCs.

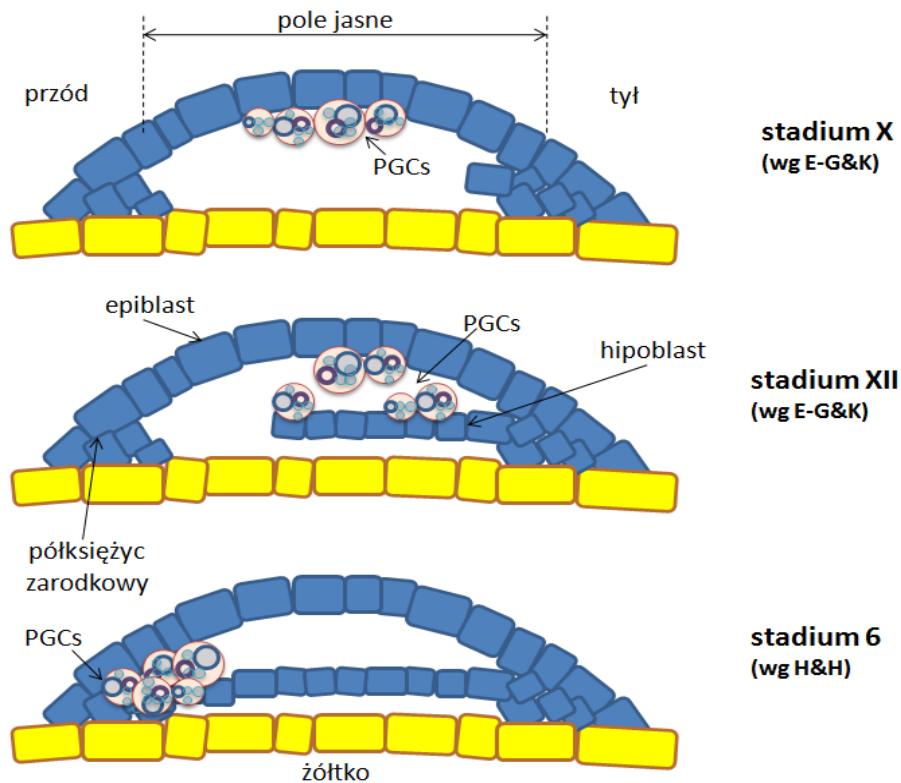
1.5. MORFOLOGICZNA I BIOLOGICZNA CHARAKTERYSTYKA PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH

Kurze pierwotne komórki płciowe oglądane pod mikroskopem to duże, okrągłe, ziarniste komórki o wymiarach 14-19 μm (Nakajima i wsp., 2011). Początkowo PGCs były identyfikowane na podstawie cech morfologicznych, takich jak: występowanie dużego sferycznego jądra o średnicy ok. 8 μm , bardzo dobrze rozwinięty aparat Golgiego i retikulum endoplazmatyczne (Fujimoto i wsp., 1976), obecności refrakcyjnych lipidów w cytoplazmie oraz licznych ziarnistości substancji zapasowych (Zhao i Kuwana, 2003). Obecnie, do identyfikacji PGCs wykorzystuje się najczęściej: i) reakcję histochemiczną PAS (ang. Periodic Acid Solution) (Meyer, 1960) - po stadium 4 barwione są ziarna zawierające materiał zapasowy w postaci glikogenu oraz ii) markery immunohistochemiczne takie jak przeciwciała SSEA-1 (stage-specific embryonic antigen-1), EMA-1 (embryonic mouse antigen-1) (Karagenc i wsp., 1996), które rozpoznają antygeny glikoproteinowe na powierzchni komórek (Nakamura i wsp., 2007) oraz CVH (chicken vasa homolog) wykazujący ekspresję charakterystyczną dla komórek płciowych (Tsunekawa i wsp., 2000; Bernardo i wsp., 2012; Nakamura i wsp., 2013). Oprócz wyżej wymienionych markerów zespół Junga i wsp., (2005) zaproponował metodę podwójnego barwienia PGCs z użyciem przeciwciał dla SSEA-3, SSEA-4, integryn $\alpha 6$ i $\beta 1$ oraz lektyn STA (*Solanum tuberosum* agglutinin) i DBA (*Dolichos biflorus* agglutinin).

Pierwotne komórki płciowe wykazują cechy pluripotencji, tzn. mogą różnicować się do wielu rodzaju komórek oraz wykazują zdolność do samoodnawiania się (Wu i wsp., 2008). W przeciwieństwie do ssaczy PGCs, kurze PGCs wraz z kolejnymi etapami migracji podczas rozwoju zarodkowego w sposób ciągły zmniejszają ekspresję genów pluripotencji i wykazują stopniową utratę cech związanych z tą właściwością. Zjawisku temu towarzyszy obniżenie zdolności PGCs do tworzenia kolonii w hodowli *in vitro* (Naeemipour i wsp., 2013).

Pierwotne komórki płciowe mogą być identyfikowane już we wczesnym stadium X, a ich dalsze różnicowanie się jest zależne od procesu formowania

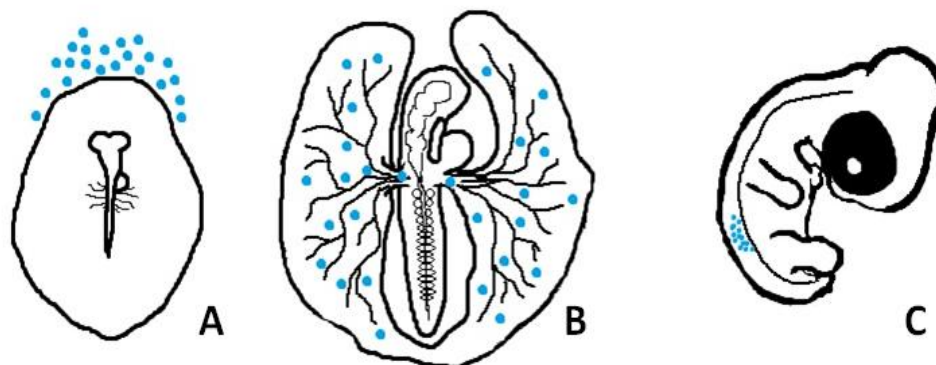
się zarodka (Ginsburg i Eyal-Giladi, 1987). Powstają one z epiblastu (Eyal-Giladi i wsp., 1981) i w stadium X rozwoju zarodkowego są zlokalizowane w centralnej części pola jasnego (Eyal-Giladi i Kohav, 1976). Początkowo, są przyczepione do tylnej strony hipoblastu, ale wraz ze wzrostem (stadium XI do XIV) przemieszczają się do jego przedniej części, by w końcu osiągnąć region półksiężyca zarodkowego (stadium 4-6) (Ryc.1). Liczba PGCs w stadium X wynosi ok. 130 i wzrasta prawie czterokrotnie w stadium 10 (Nakamura i wsp., 2007).



Ryc.1. Formowanie się i migracja pierwotnych komórek płciowych w pierwszych stadiach rozwojowych zarodka kurzego (opracowanie własne na podstawie Simkiss, 1994; Tagami i Kagami, 1998; Han, 2009 i Bernardo i wsp., 2012). Rzymskie litery oznaczają stadia rozwojowe wg Eyal-Giladi i Kohav (1976), natomiast arabskie wg Hamburger i Hamilton (1951).

W stadium 10-12, kiedy formują się naczynia krwionośne (Ryc.2), PGCs przechodzą do krwioobiegu zarodka, skąd poprzez krew dostają się do zawiązków gonad (stadium 20-24), tam osiadają, namnażają się i zaczynają się różnicować w męskie i żeńskie komórki rozrodcze (Chojnacka-Puchta i wsp., 2012). Przed rozpoczęciem 14ego dnia życia embriona podziały mitotyczne

PGCs ustają (można zaobserwować wtedy ok. 26000 PGCs w gonadach) i rozpoczyna się proces gametogenezy (Mochizuki i Matsui, 2010).



Ryc.2. Migracja PGCs w zarodku kurzym; A-stadium 12; B- stadium 17; C- stadium 28; stadia rozwojowe wg Hamburger i Hamilton (1951) (opracowanie własne na podstawie Simkiss, 1994; Hong i wsp., 1995; Tagami i Kagami, 1998 i Han, 2009).

Istnieje kilka możliwych mechanizmów dzięki którym możliwy jest ruch PGCs (Kuwana, 1993). Należą do nich: własny ruch, ruch wywołany przez fizyczny kontakt z otaczającymi komórkami somatycznymi, powinowactwo do niektórych komórek lub zewnątrzkomórkowych macierzy takich jak fibronektyna, pasywna migracja przez morfogenetyczny ruch oraz migracja wywołana czynnikami chemotaktycznymi. Istniało także przypuszczenie, że krążące we krwi PGCs są chemicznie przyciągane przez związki uwalniane z gonad (Kuwana i Rogulska, 1999). Sama migracja jest wspomagana przez zewnątrzkomórkowy matrix, którego związki ułatwiają adhezję PGCs podczas ich drogi poprzez krwiobieg do gonad (D'Costa i wsp., 2001) oraz chemokiny SDF-1, których obecność jest niezbędna do procesu migracji (Stebler i wsp., 2004; Rehim i wsp., 2008). Te unikalne właściwości migracyjne umożliwiają produkowanie chimer płciowych przez iniekcję PGCs dawców do krwiobiegu zarodków biorców w 3-3,5 dobie ich rozwoju.

1.6. METODY IZOLACJI PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH

Wyjątkowe właściwości migracyjne PGCs do zawiązków gonad poprzedzone swobodną ich cyrkulacją w krwiobiegu zarodków stwarzają możliwości izolacji tych komórek z: i) blastodermy w stadium X; ii) z krwi 2,5-3-dniowych zarodków (stadia 13-17) oraz iii) z gonad 5-7 dniowych zarodków (stadia 26-31) (Chojnacka-Puchta i wsp., 2012). Poniżej opisano wszystkie 3 metody izolacji kurzych PGCs w celu tworzenia chimer płciowych.

Izolując PGCs z blastodermis ze stadium X zespół Petitte (1990) po raz pierwszy wyprodukował kurzą chimerę płciową poprzez oddzielenie komórek blastodermalnych zawierających PGCs i wprowadzenie ich pod tarczkę zarodkową biocy w tej samej fazie rozwoju embrionalnego. Uzyskany w ten sposób kogut posiadał funkcjonalne plemniki. Jednakże ze względu na bardzo niską wydajność kurcząt oraz niewielką liczbę PGCs w fazie X opisany wyżej sposób produkcji chimer jest mało popularny.

W przeciwieństwie do ssaków, ptasie PGCs wykorzystują układ krwionośny formującego się zarodka, jako środek transportu z regionu półksiężyca zarodkowego do przyszłych gonad. W związku z tym krew zarodkowa w stadiach 13-17 staje się potencjalnym źródłem PGCs do produkcji kurcząt chimer. W szczególności krew pochodząca ze stadium 14 wydaje się być najbardziej odpowiednia do tego celu, gdyż koncentracja cyrkulujących PGCs jest wtedy najwyższa (Tajima i wsp., 1999). Biorąc pod uwagę powyższe, Tajima i wsp., (1993) z powodzeniem wyizolował za pomocą szklanej mikropipety pierwotne komórki płciowe z krwiobiegu zarodków dawców, a następnie wprowadził je do krwiobiegu zarodków biocy na tym samym etapie rozwoju uzyskując tym sposobem chimery płciowe. Ponadto, zespół Naito i wsp., (2004) wykazał, iż PGCs wyizolowane z krwi i wprowadzone do blastodermis w stadium X z powodzeniem dostają się do krwiobiegu zarodków biocy, skąd następnie migrują w kierunku gonad. Wadą metody izolacji PGCs z krwi zarodkowej jest trudność wykonania zabiegu oraz bardzo mała liczba uzyskanych PGCs (ok 0,048% całej krwi) (Yasuda i wsp., 1992) co ogranicza zastosowanie tej metody izolacji do bardziej zaawansowanych technicznie manipulacji transgenicznych. Należy jednak podkreślić fakt, iż uzyskane chimery płciowe metodą izolacji PGCs z krwi zarodkowej cechuje wysoki stopień transmisji linii germinalnej (11,3-96%) w porównaniu do chimer uzyskanych metodą izolacji PGCs z tarczki zarodkowej (Han, 2009).

Najczęstszym sposobem pozyskiwania PGCs jest ich izolacja z gonad 5-7-dniowych zarodków. W celu uwolnienia komórek, gonady rozdrabnia się i/lub nadtrawia 0,25% roztworem trypsyny-EDTA. W porównaniu do pozostałych dwóch metod liczba PGCs uzyskanych tym sposobem w przeliczeniu na jeden zarodek jest najwyższa, co zwiększa powodzenie generacji chimer. Wykazano między innymi, iż chimery płciowe mogą być produkowane przez wprowadzenie PGCs uzyskanych z gonad 5-dniowych zarodków dawców do naczyń krwionośnych zarodków biocy w stadium 15-16 (Tajima i wsp., 1998). Dowiedziono także, iż komórki wyizolowane z gonad (stadium 27) i iniekowane do zarodków w stadium X i 17 również ulegają prawidłowemu rozwojowi i tworzą gamety (Mozdziak i wsp., 2006). Badania te w prosty sposób pokazują, iż PGCs uzyskane z gonad, zdolne są do ponownej migracji i różnicowania się w funkcjonalne gamety u zarodków biocy, nawet po przejściu fazy migracji u zarodków dawców.

1.7. DOBÓR GENOTYPU DAWCY I BIORCY PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH

Pierwotne komórki płciowe mogą być przenoszone pomiędzy zarodkami w sposób allogeniczny i ksenogeniczny, tzn. pomiędzy dawcami i biorcami tego samego gatunku (np. "kura" do "kura") oraz pomiędzy dawcami i biorcami różnych gatunków (np. "przepiórka" do "kura"). W pierwszym przypadku można wyróżnić dwa dodatkowe warianty obejmujące transfer pomiędzy takimi samymi bądź różnymi rasami i/lub typami towarowymi kur. Na podstawie literatury zgromadzonej w bazie Web of Science, przeprowadzono analizę doboru dawców i biorców komórek PGCs, którą zestawiono w tabeli 3. Uważa się, iż dobór genotypów do roli dawców i biorców PGCs ma znaczący wpływ na migrację oraz wzrost populacji introdukowanych PGCs (Ishiguro i wsp., 2009; Kang i wsp., 2009), a co za tym idzie na stopień transmisji germinalnej (Nakamura i wsp., 2013).

Międzygatunkowe oraz międzyrasowe chimery płciowe z powodzeniem były wytwarzane przez iniekcję PGCs pochodzących od różnych gatunków (Kang i wsp., 2008; Ishiguro i wsp., 2009; Kang i wsp., 2009; Wernery i wsp., 2010; Kang i wsp., 2011; van de Lavoie i wsp., 2012; Park i Han, 2013) i ras ptaków (Tajima i wsp., 1998; Park i wsp., 2003a i 2003b; van de Lavoie i wsp., 2006; Kim i wsp., 2010; Nakamura i wsp., 2010; Nakajima i wsp., 2011; Nakamura i wsp., 2011; Nakamura i wsp., 2012; Park i Han, 2012b; Miyahara i wsp., 2014) do zarodków biorców. Udowodniono tym samym, iż PGCs różnych gatunków mogą migrować do gonad biorców i normalnie mnożyć się w zróżnicowanych gonadach (Park i wsp., 2014). Wciąż jednak brak jest badań weryfikujących przydatność różnych ras i typów towarowych kurcząt do produkcji chimer płciowych.

Z produkcją chimer płciowych wiąże się inkorporacja egzogennych PGCs do endogennych tkanek gonad embrionów biorców. W związku z tym dochodzi tam do swoistej rywalizacji pomiędzy dwiema populacjami pierwotnych komórek płciowych - endo- i egzogennej, co prowadzi do wytwarzania dwóch rodzajów komórek płciowych - wywodzących się od dawców i biorców (gospodarzy). Stąd, odsetek gamet pochodzenia egzogennej jest określany przez stosunek liczby komórek płciowych gospodarza do komórek sztucznie wprowadzonych do gonad zarodków biorców (Nakamura i wsp., 2013). Na liczbę tę mogą mieć wpływ dwa czynniki. Pierwszy z nich to zdolność komórek płciowych do podziałów mitotycznych, która różni się w zależności od rasy kurcząt. Dla przykładu rasy kur takie jak White Leghorn, Barred Plymouth Rock i Fayoumi różnią się zdolnością do przyjmowania obcych PGCs, osiągając najlepsze wyniki dla pierwszej z wymienionych ras, a najgorsze dla Barred Plymouth Rock. Drugim czynnikiem regulującym stosunek liczby komórek płciowych gospodarza do komórek sztucznie wprowadzonych jest liczba egzogennych PGCs, które dotarły do gonad i je skolonizowały oraz liczba obecnych już tam, endogennych PGCs. Proporcje pomiędzy nimi można

zwiększyć poprzez całkowite usunięcie bądź częściową sterylizację endogennych PGCs. Różne techniki sterylizacji zarodków biorców przedstawiono w następnym rozdziale.

Tab. 3. Kombinacje dawców i biorców komórek w generacji ptasich chimer.

autorzy	gatunki / rasy dawca → biorca
transfer ksenogeniczny	
Gao i wsp., (2011)	Przepiórka japońska (<i>Coturnix japonica</i>) → Kaczka Pekin (<i>Anas platyrhynchos</i>)
Ishiguro i wsp., (2009)	Kura (<i>Gallus domesticus</i>) → Przepiórka japońska (<i>Coturnix japonica</i>)
Kang i wsp., (2008)	Bażant (<i>Phasianus colchicus</i>) → Kura (<i>Gallus domesticus</i>)
Kang i wsp., (2009)	Bażant (<i>Phasianus colchicus</i>) → Kura (<i>Gallus domesticus</i>)
Ono i wsp., (1996)	Przepiórka japońska (<i>Coturnix japonica</i>) → Kura (<i>Gallus domesticus</i>)
van de Lavoie, (2012)	Kura (<i>Gallus domesticus</i>) → Perlica zwyczajna (<i>Numida meleagris</i>)
Wernery i wsp., (2010)	Hubara saharyjska (<i>Chlamydotis undulata</i>) → Kura (<i>Gallus domesticus</i>)
Yasuda i wsp., (1992)	Kura (<i>Gallus domesticus</i>) → Przepiórka japońska (<i>Coturnix japonica</i>)
transfer allogeniczny	
Chang i wsp., (1997)	Korean Ogoł Chicken → White Leghorn
Jung i wsp., (2010)	
Kim i wsp., (2010)	
Lee i wsp., (2006)	
Park i wsp., (2003b)	
Park i wsp., (2010)	
Jeong i Han, (2002)	
Han i wsp., (2002)	White Leghorn → Korean Ogoł Chicken
Park i Han, (2000)	
Park i wsp., (2003a)	
Nakajima i wsp., (2011)	White Leghorn → Rhode Island Red
Shiue i wsp., (2009)	White Leghorn → Taiwan Country Chicken
Zhang i wsp., (2013)	Black Boned Chicken → Suqin Yellow Chicken
Kagami i wsp., (1997)	Barred Plymouth Rock → White Leghorn
Miyahara i wsp., (2014)	
Naito i wsp., (1994)	
Naito i wsp., (2001)	
Nakamura i wsp., (2010)	
Nakamura i wsp., (2012)	
Song i wsp., (2005)	
Speksnijder i wsp., (1999)	
Tagami i wsp., (1997)	
van de Lavoie i wsp., (2006)	
Naito i wsp., (1994)	White Leghorn → Barred Plymouth Rock
Naito i wsp., (1998)	
Tagami i wsp., (1997)	
Tajima i wsp., (1998)	
Kim i wsp., (2005)	Czarna przepiórka → Przepiórka typu dzikiego

1.8. METODY STERYLIZACJI ZARODKÓW BIORCÓW

Dążąc do zwiększenia wydajności transmisji germinacyjnej oraz modyfikacji genetycznych wypracowano szereg sposobów inaktywacji i usunięcia endogennych PGCs zarodków biorców (Wentworth i wsp., 1989). Do najważniejszych z nich należą: i) chirurgiczne usunięcie (Naito i wsp., 1994; Kagami i wsp., 1997), ii) inaktywacja promieniowaniem UV (Reynaud, 1976), promieniowaniem X (Lim i wsp., 2006; Nakamura i wsp., 2012) i γ (Carsience i wsp., 1993) oraz iii) chemiczne traktowanie busulfanem (Aige-Gil i Simkiss, 1991b; Furata i Fujihara 1999; Song i wsp., 2005; Nakamura i wsp., 2009; Lee i wsp., 2013) i tamoxifenem (Mohsen i Ahmed, 2002).

Mechaniczne usunięcie komórek blastodermalnych z centralnej części *area pellucida* stadium X jest technicznie trudne, jednak w porównaniu do metod bazujących na promieniowaniu, daje dużo lepsze rezultaty (Motono i wsp., 2009). Inną powszechnie stosowaną metodą jest usunięcie części krwi z krwiobiegu rozwijającego się 2-3,5-dniowego zarodka bezpośrednio przed iniekcją egzogennych PGCs. Metoda ta wymaga jednak ogromnej precyzji, a liczba usuniętych w ten sposób PGCs jest bardzo niewielka (Naito i wsp., 1994). Z kolei, promieniowanie gamma, X, czy UV działając na komórki docelowe uszkodzają DNA, co zaburza ciągłość wszystkich cykli komórkowych i w konsekwencji doprowadza do śmierci komórki. Komórki płciowe w przeciwieństwie do komórek somatycznych są bardziej podatne na promieniowanie, co wykorzystuje się w sterylizacji zarodków biorców (Nakamura i wsp., 2013). Kolejna metoda pozbawienia zarodków gonadalnych PGCs wykorzystuje substancje chemiczne. Środkiem, który przebadano u zarodków kurzych pod kątem właściwości sterylizujących jest tamoxifen, jednak jego skuteczność w eliminacji endogennych PGCs jest niewielka (Mohsen i Ahmed, 2002). Najczęściej wykorzystywany jest w tym celu cytostatyk busulfan (Furata i Fujihara, 1999; Song i wsp., 2005; Nakamura i wsp., 2009; Nakamura i wsp., 2010; Lee i wsp., 2013). Jest to czynnik alkilujący wywołujący w komórkach płciowych proces apoptozy. Oprócz swych właściwości sterylizujących, traktowanie busulfanem może powodować wiele efektów ubocznych, takich jak teratogenność, niepłodność oraz śmierć (Lee i wsp., 2013). Pomimo wysokiej skuteczności busulfanu, w zmniejszaniu endogennych liczby PGCs, problemem pozostaje jego działanie uboczne, powodujące nieprawidłowości w rozwoju zarodków oraz ich wysoką śmiertelność. Strukturalny analog busulfanu- treosulfan wydaje się być doskonałą alternatywą w chemosterylizacji zarodków kurzych ze względu na niską toksyczność i dobrą rozpuszczalność w wodzie (Brink i wsp., 2014). Jednak, do tej pory ten cytostatyk nie był stosowany w tego typu badaniach.

1.9. CEL PRACY

Celem pracy było opracowanie kompleksowej metody służącej do tworzenia kurzych chimer płciowych, poprzez optymalizację metod izolacji pierwotnych komórek płciowych (PGCs), dobór dawców i biorców komórek oraz sterylizację zarodków biorców, jako czynników mających wpływ na zachowanie się pierwotnych komórek płciowych dawcy w organizmie biorcy.

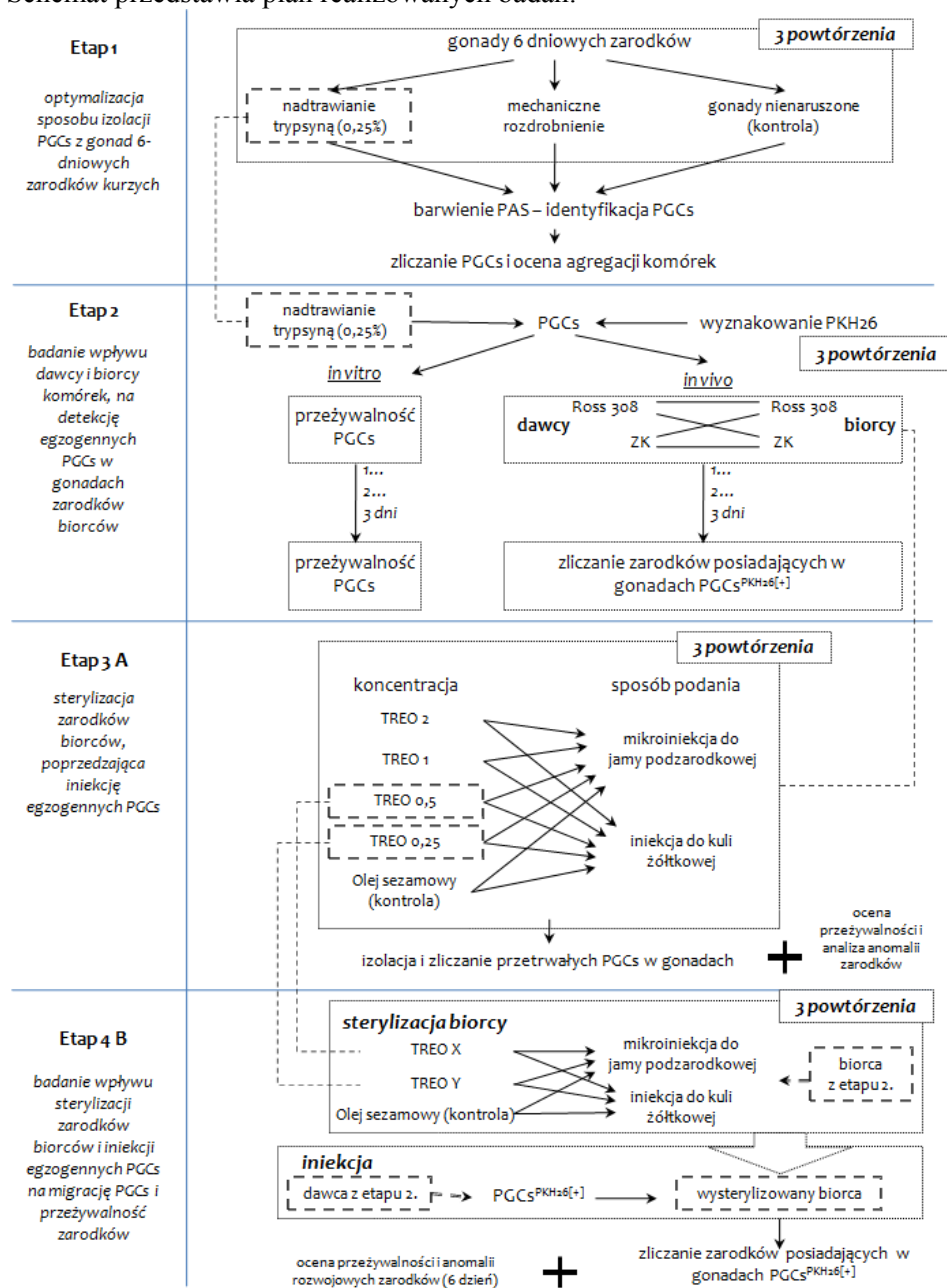
W realizacji pracy uwzględniono następujące zadania:

1. Optymalizacja sposobu izolacji PGCs z gonad 6-dniowych zarodków kurzych,
2. Badanie wpływu dawcy i biorcy komórek, na detekcję egzogennych PGCs w gonadach zarodków biorców,
3. Optymalizacja dawki i sposobu podania treosulfanu jako nowej metody sterylizacji zarodków biorców,
4. Badanie wpływu sterylizacji zarodków biorców i iniekcja pierwotnych komórek płciowych dawców na przeżywalność i rozwój zarodków biorców.

2. MATERIAŁ I METODY

2.1. PLAN BADAŃ

Schemat przedstawia plan realizowanych badań:



2.2. MATERIAŁY UŻYTE W PRACY

2.2.1. Jaja wylęgowe

Materiał badawczy wykorzystany w pracy stanowiły zapłodnione kurze (*Gallus gallus domesticus*) jaja wylęgowe pochodzące od kur mięsnych, Ross 308 (Drobex Agro; Makowska) oraz od rodzimej rasy ogólnoużytkowej kur zielononóżki kuropatwianej - ród ZS-11 (G. Skórnicki; Duszniaki Wielkopolskie).

2.2.2. Sprzęt laboratoryjny

- inkubator do jaj - aparaty lęgowe Fest; ALMD1-N3
- mikroskop stereoskopowy - MST 132
- inkubator CO₂ do hodowli komórkowych - Smart Cell HF-90; Heal Force
- blok grzewczy - AccuBlock Digital Dry Bath D1200; Labnet
- komora Bürker'a - Mareinfeld
- mikroskop odwrócony z lampą fluorescencyjną - Axiovert 40CFL; Zeiss
- mikroskop fluorescencyjny - MN800 FL; OPTA-TECH
- zestaw do mikromanipulacji - InjectMan® NI2; CellTram® Oil; Eppendorf
- szklane mikrokapilary iniekcyjne - MAS lab
- aparat fotograficzny - Olympus u820

2.2.3. Odczynniki

- PBS - Phosphate Buffered Saline; tablets; Fisher Scientific; POCH
- PBS[-] - Phosphate Buffered Saline1x; [-] Calcium Chloride; [-] Magnesium Chloride; Gibco® Invitrogen
- PKH26 - Red Fluorescent Cell Linker Kits for General Cell Membrane Labeling; Sigma-Aldrich
- FBS- Fetal Bovine Serum; Gibco® Invitrogen
- Pen-Strep -Penicillin-Streptomycin; Sigma-Aldrich
- Błękit trypanu - 0,4%; Sigma-Aldrich
- PAS i Schiff reagent - PAS staining system; Sigma-Aldrich
- trypsyna-EDTA - 1x; Sigma-Aldrich
- OPTI-MEM® I Reduced Serum Medium - 1x; Gibco® Invitrogen
- Treosulfan - 1000mg; Ovastat®; Medac
- Aqua pro injectione - Polpharma
- olej sezamowy - Haitoglou Bros

2.2.4. Pozostałe materiały

- parafilm - Parafilm® M; Sigma-Aldrich
- igły - Microfine + U40; 0,3 x 8mm; BD
- igły - 0,6 x 25mm i 0,9 x 40; Terumo
- płytki 4-dołkowe - SPL Life Sciences
- płytki 96-dołkowe - BD Falcon

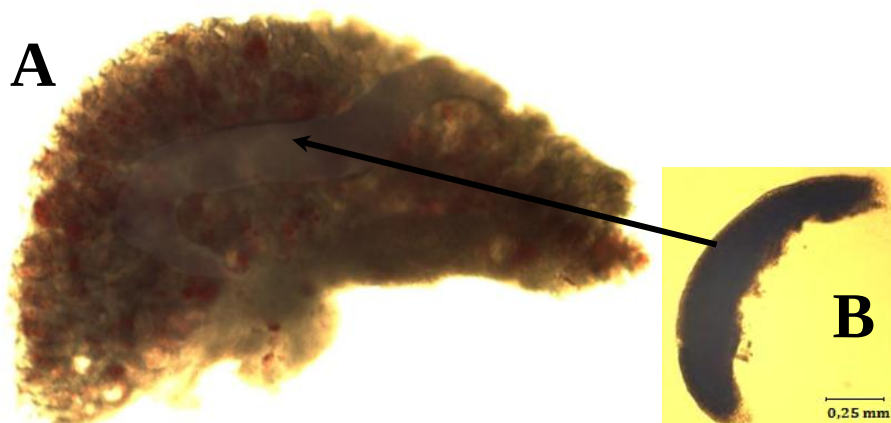
2.3. OPTYMALIZACJA SPOSOBU IZOLACJI PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH Z GONAD 6-DNIOWYCH ZARODKÓW KURZYCH

2.3.1. Inkubacja jaj

Jaja inkubowano przez 6 dni, w temperaturze 37,8°C i przy wilgotności 62-65%. Po osiągnięciu przez zarodki stadium 28-29 wg H&H przeznaczono je do izolacji PGCs.

2.3.2. Izolacja PGCs z gonad 6-dniowych zarodków

Zarodki podzielono losowo na trzy grupy, po 24 osobniki, z których przy pomocy mikronarzędzi (igły 0,3 x 8mm, nożyczki) w polu obserwacji mikroskopu stereoskopowego, wyizolowano śródnercza (Fot. 1).



Fot.1. Śródnercze (A) z widoczną gonadą oraz wyizolowana gonada (B); MN800 FL OPTA-TECH.

Następnie, oddzielono gonady i umieszczono je w probówce w 0,1 ml roztworu PBS (ang. Phosphate Buffered Saline) (Fot. 2) pozbawionego jonów Ca^{2+} i Mg^{2+} - określany dalej jako PBS[-].



Fot.2. Wyizolowane gonady, umieszczone w roztworze PBS[-].

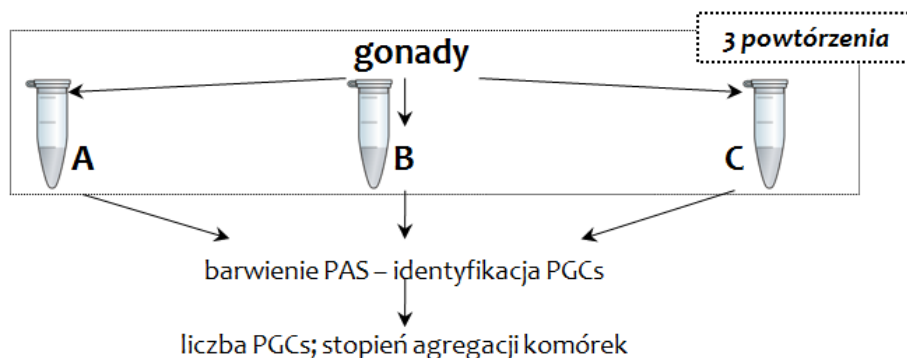
Tak wyizolowane gonady podzielono na trzy grupy (Ryc.3):

- **A** - Gonady rozdrobnione mechanicznie, następnie umieszczone w 0,5 ml PBS[-] i inkubowane na płytce 4-dołkowej do hodowli komórkowej w 37,8°C i 5% nasyceniu CO_2 przez 1 godzinę - 3 powtórzenia po 8 zarodków (po 16 gonad).
- **B** - Gonady nadtrawione po izolacji (trawienie przez 1 minutę w 37°C) 0,25% roztworem trypsyny-EDTA (enzym unieczynniono 10% dodatkiem FBS - Fetal Bovine Serum), oczyszczone z resztek trypsyny-EDTA (wirowanie; 5 min.; 2500 rpm) i następnie umieszczone w 0,5 ml PBS[-] i inkubowane na płytce 4-dołkowej do hodowli komórkowej w 37,8°C i 5% nasyceniu CO_2 przez 1 godzinę - 3 powtórzenia po 8 zarodków (po 16 gonad).
- **C** - Gonady "nienaruszone" - umieszczone w 0,5 ml PBS[-] i inkubowane na płytce 4-dołkowej do hodowli komórkowej w 37,8°C i 5% nasyceniu CO_2 przez 1 godzinę - 3 powtórzenia po 8 zarodków (po 16 gonad). Po zakończonej inkubacji, zawartość dołków przepipetowano kilka razy i sprawdzono pod kątem obecności agregatów PGCs w polu widzenia mikroskopu odwróconego.

2.3.3. Określenie liczby i przeżywalności PGCs

Uzyskane PGCs wybarwiono 0,4% błękitem trypanu, a następnie przy pomocy komory Bürker'a i mikroskopu odwróconego zliczono komórki martwe

(wybarwione na niebiesko) i żywe (niewybarwione) w celu określenia procentowej przeżywalności.



Ryc.3. Schemat izolacji PGCs z gonad.

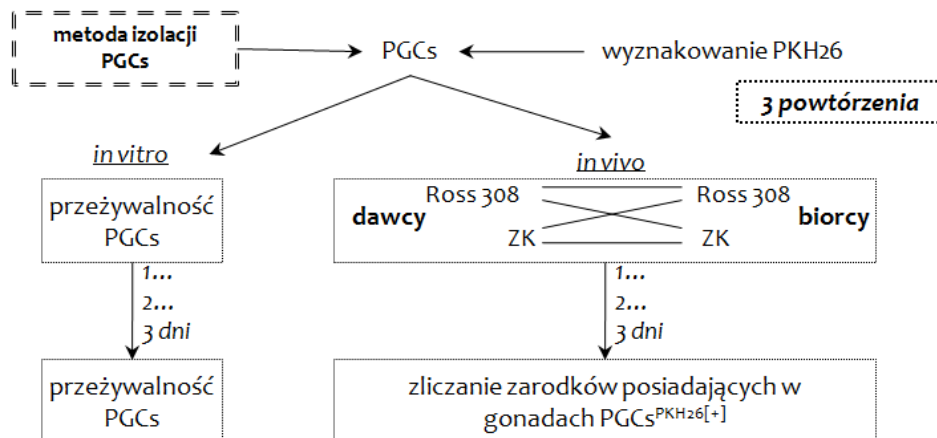
2.3.4. Identyfikacja PGCs - barwienie PAS

PGCs poddano standardowemu barwieniu PAS (w tym celu wykorzystano kit - PAS staining system) na obecność materiału zapasowego w postaci ziaren glikogenu. Jest to charakterystyczna reakcja dla pierwotnych komórek płciowych (Meyer, 1960). Komórki utrwalono w 4% formaldehydzie, wypłukano dwa razy w roztworze PBS i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut w obecności odczynnika PAS. Po tym czasie komórki ponownie dwukrotnie przepłukano roztworem PBS i poddano działaniu roztworem Schiff'a przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Odczynnik usunięto przez kolejne płukania w roztworze PBS. Preparat został poddany analizie pod mikroskopem OPTA-TECH.

2.4. BADANIE WPŁYWU DAWCY I BIORCY KOMÓREK NA DETEKCJĘ EGZOGENNYCH PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH W GONADACH ZARODKÓW BIORCÓW

2.4.1. Ogólny plan doświadczenia

Na podstawie wyników z etapu pierwszego wybrano optymalną metodę izolacji PGCs z gonad zarodków dawców. Wyizolowane komórki hodowano w inkubatorze CO₂ przy pełnej wilgotności, bądź poddano iniekcji do krwiobiegu zarodków biorców w stadium 15-19 wg H&H (Ryc.4). Doświadczenie wykonano w 3 powtórzeniach.



Ryc.4. Schemat doświadczenia drugiego.

Liczba zainiekowanych zarodków w różnych układach nie była taka sama, wynikała bowiem z kondycji zarodka. Wyjściowo, w każdej grupie do iniekcji przeznaczono po 60 zarodków.

2.4.2. Inkubacja jaj

Jaja dawców komórek PGCs inkubowano przez 6 dni, a jaja biorców przez 3,5 dnia w temperaturze 37,8°C i przy wilgotności 62-65%. Po osiągnięciu przez zarodki odpowiednio stadium 28-29 oraz 15-19 wg H&H przeznaczono je do izolacji lub iniekcji PGCs.

2.4.3. Izolacja PGCs z gonad 6-dniowych zarodków dawców

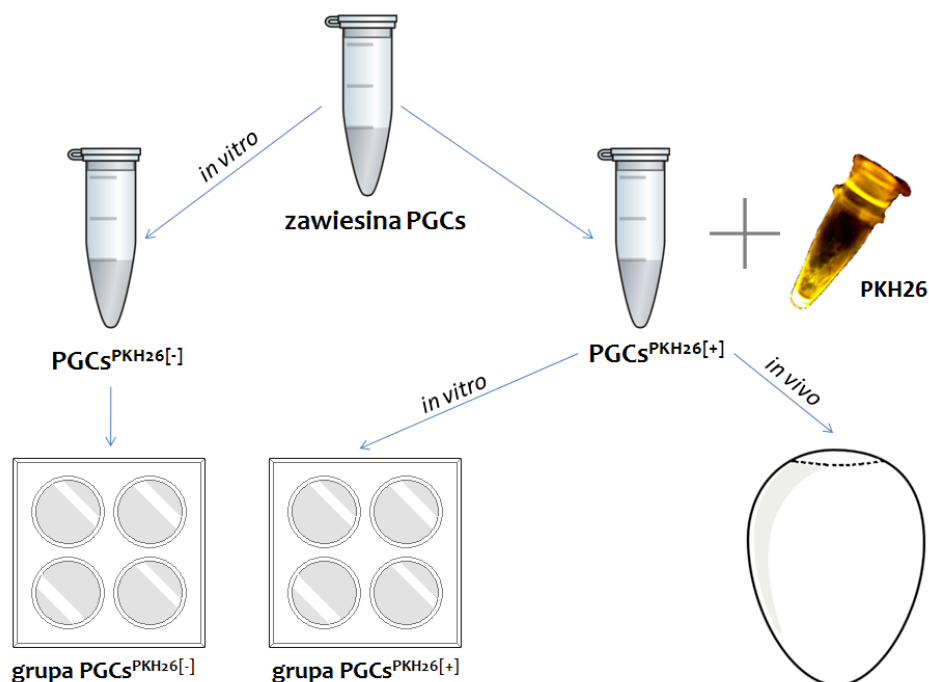
Gonady pozyskane w sterylnych warunkach od 6-dniowych zarodków kurzych przy pomocy mikronarzędzi i mikroskopu stereoskopowego, umieszczono w 100µl roztworu PBS z antybiotykiem Pen-Strep 100:1 (ang. Penicillin Streptomycin). Kolejne procedury odbywały się w komorze z laminarnym przepływem powietrza, gdzie materiał biologiczny był utrzymywany na bloku grzewczym w temperaturze 37,8°C. W celu uwolnienia PGCs gonady zostały nadtrawione przez 1 minutę 0,25% roztworem trypsyny-EDTA (37°C), tak jak miało to miejsce we wcześniejszym etapie. Trawienie zatrzymano poprzez dodanie 10% FBS, a roztwór trypsyny-EDTA usunięto przez odwirowanie (2500 rpm; 5 min). Komórki inkubowano przez kolejną godzinę w objętości 0,5 ml PBS[-], w 37,8°C i 5% nasyceniu CO₂. Po tym czasie otrzymaną zawiesinę PGCs ponownie zwirowano (2500 rpm; 5 min), a otrzymany osad zawieszono w 0,5 ml medium OPTI-MEM® I i zliczono w komorze Bürker'a w polu widzenia mikroskopu odwróconego.

2.4.4. Znakowanie pierwotnych komórek płciowych fluorochromem PKH26

Otrzymaną zawiesinę PGCs podzielono na 2 części (Ryc.5.):

1. grupa PGCs^{PKH26[-]} - do 3-dniowej hodowli *in vitro* w celu oceny przeżywalności komórek niewyznakowanych PKH26; pobrano 100µl zawiesiny komórek (ok. 1/5 całości) i przeniesiono na 4-dołkową płytkę. Hodowlę uzupełniono 400µl medium OPTI-MEM® I, 5% dodatkiem FBS i 1% dodatkiem Pen-Strep. Komórki inkubowano do momentu detekcji fluorescencji (w gonadach zarodków biorców) w temperaturze 37,8°C i 5% nasyceniu CO₂ przez 3 dni. Równocześnie z detekcją fluorescencji nastąpiła ocena hodowli *in vitro* PGCs. Komórki pobrano z dołków i liczono tak jak w punkcie 2.3.3.

2. grupa PGCs^{PKH26[+]} - do iniekcji do zarodków oraz do oceny przeżywalności komórek po wyznakowaniu PKH26; pozostałe komórki (4/5 całości), zwirowano (2500 rpm; 5 min), usunięto supernatant i poddano znakowaniu PKH26 zgodnie z dołączoną instrukcją. Wyznakowane komórki zawieszono w 500µl medium OPTI-MEM® I i zliczono w komorze Bürker'a w polu widzenia mikroskopu odwróconego. Podobnie jak w przypadku grupy PGCs^{PKH26[-]}, zawiesina została uzupełniona o 5% dodatek FBS i 1% Pen-Strep. Tak wyznakowane PGCs przeznaczono do iniekcji do zarodków biorców.



Ryc.5. Schemat podziału i wykorzystania uzyskanej zawiesiny komórek PGCs

2.4.5. Iniekcja PGCs do 3,5-dniowych zarodków biorców

Zdezynfekowane jaja 3,5-dniowych biorców nawiercono w tępych końcach (o otworu - 1cm), w miejscu gdzie znajduje się komora powietrzna, tak aby nie uszkodzić wewnętrznej błony pergaminowej.

Komórki PGCs^{PKH26[+]} zwirowano (2500 rpm; 5 min) i zawieszono w 100µl świeżego medium OPTI-MEM® I. Do zawiesiny dodano 10µl FBS i 2µl antybiotyku Pen-Strep. Przy pomocy zestawu do mikromanipulacji wprowadzono 1-2 µl zawiesiny komórek do krwiobiegu zarodków (aorta grzbietowa). Po skończonej iniekcji jaja zabezpieczono parafilmem i inkubowano przez 3 kolejne dni w temperaturze 37,8°C i przy wilgotności 62-65%.

Komórki, które pozostały po mikroiniekcji ponownie zliczono, następnie przeniesiono na hodowlaną płytkę 4-dółkową i kontynuowano inkubację po uzupełnieniu w medium OPTI-MEM® I, 5% FBS i 1% antybiotyków Pen-Strep (grupa PGCs^{PKH26[+]} - w celu oceny przeżywalności komórek po wyznakowaniu PKH26).

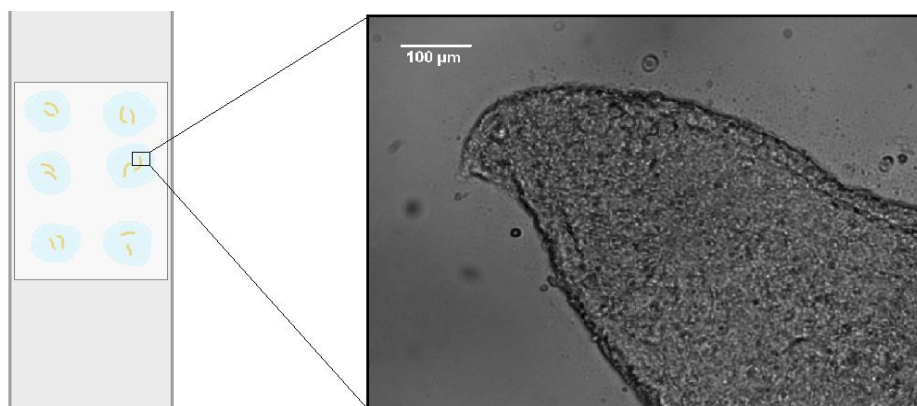
2.4.6. Ocena przeżywalności PGC hodowanych *in vitro* przed i po wyznakowaniu PKH26

Po trzech dniach hodowli *in vitro*, komórki niewyznakowane (grupa PGCs^{PKH26[-]}) i wyznakowane PKH26 (grupa PGCs^{PKH26[+]}) zliczono w komorze Bürker'a pod mikroskopem odwróconym w celu oszacowania przeżywalności komórek podczas inkubacji. Do rozróżnienia komórek martwych i żywych wykorzystano 0,4% błękit trypanu. Komórki podczas oceny miały 9 dni (izolowane z zarodków 6-dniowych + 3 dni hodowli *in vitro*).

2.4.7. Detekcja fluorescencji PGCs w gonadach zarodków biorców

Gonady wyizolowane od 6-dniowych zarodków biorców umieszczono w kropli PBS na szkiełku podstawowym (każda para gonad umieszczana w osobnej kropli) (Ryc.6.).

Fluorescencję detekowano pod mikroskopem odwróconym z lampą fluorescencyjną (zakres długości fal: 551-567 nm). Zliczono zarodki u których odnotowano obecność wyznakowanych PKH26 pierwotnych komórek płciowych w formie okrągłych, pojedynczych punktów o średnicy wynoszącej od 14 do 19µm bądź skupisk w formie agregatów.



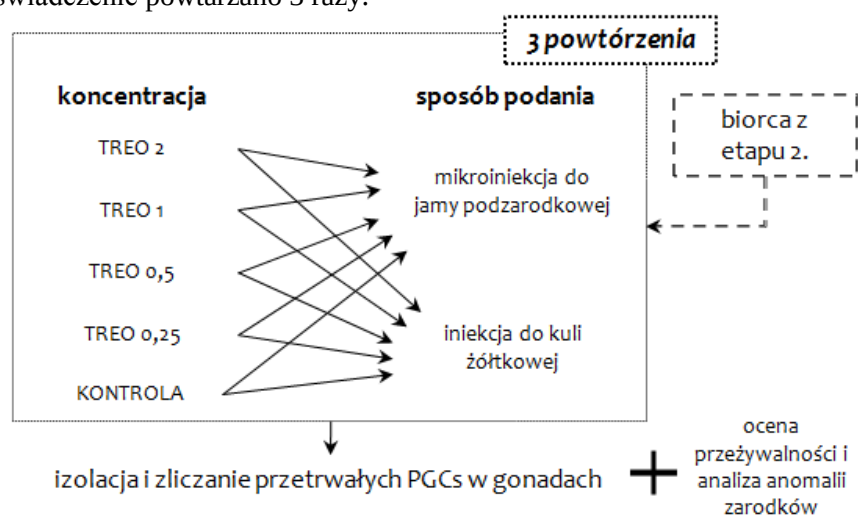
Ryc.6. Obserwacja gonad pod mikroskopem odwróconym; Axiovert 40CFL Zeiss

2.5. METODA STERYLIZACJI ZARODKÓW BIORCÓW I JEJ WPŁYW NA ICH PRZEŻYWALNOŚĆ I ROZWÓJ

2.5.1. Optymalizacja dawki i sposobu iniekcji treosulfanu

2.5.1.1. Ogólny plan eksperymentu

Na podstawie wyników poprzedniego etapu, biorcami w tym doświadczeniu były zarodki zielononózki kuropatwianej, które sterylizowano na dwa sposoby (iniekcja pod tarczkę zarodkową do jamy podzarodkowej lub iniekcja do kuli żółtkowej) czterema różnymi rozcieńczeniami treosulfanu - 8 kombinacji plus dwie grupy kontrolne (Ryc.7). Po osiągnięciu przez zarodki 6-dnia rozwoju, oceniono ich przeżywalność i liczbę przetrwałych PGCs. Doświadczenie powtarzano 3 razy.



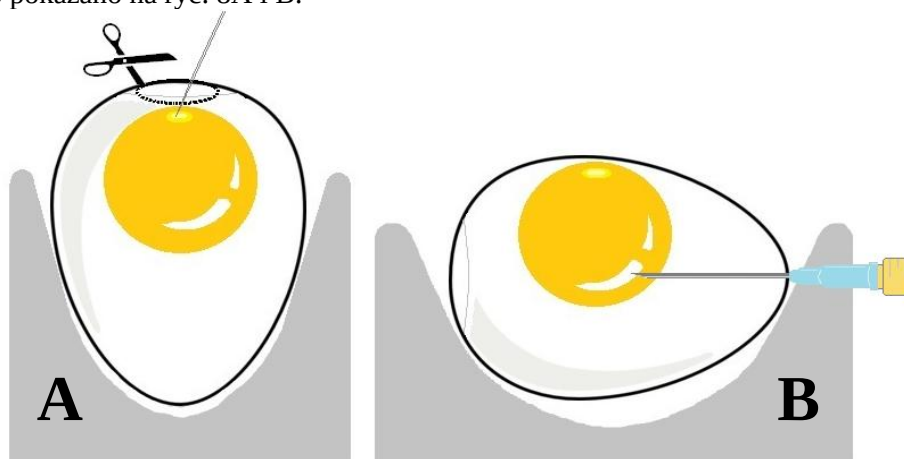
Ryc.7. Schemat doświadczenia trzeciego A.

2.5.1.2. Przygotowanie jaj do sterylizacji

Jaja podzielono na dwie grupy i utrzymywano w temperaturze pokojowej przez 2-3 dni do momentu rozpoczęcia eksperymentu, w celu ustabilizowania się pozycji tarczki zarodkowej. Jaja osadzano w odpowiedniej pozycji:

- tępym końcem do góry - dla grupy I gdzie cytostatyki iniekowano do jamy podzarodkowej,
- w pozycji horyzontalnej - dla grupy II, gdzie cytostatyki podawano do kuli żółtkowej.

Ułożenie miało na celu przemieszczenie i ustabilizowanie tarczki zarodkowej. Po tym czasie, jaja oczyszczono i zdezynfekowano. Pierwszą grupę nawiercono w tępym końcu w celu uwidocznienia tarczki zarodkowej. Drugą grupę jaj nakłuto przy pomocy igły (0,9 x 40mm) w ostrym końcu tak jak to pokazano na ryc. 8A i B.



Ryc.8. Sposoby wprowadzania treosulfanu do jaja (**A** - grupa I - iniekcja do jamy podzarodkowej; **B** - grupa II - iniekcja do kuli żółtkowej).

2.5.1.3. Przygotowanie rozcieńczeń treosulfanu

Treosulfan rozpuszczono w 10ml roztworu Aqua pro injectione tworząc stock o stężeniu 100mg/ml. Następnie stock ten rozcieńczono 50, 100, 200 i 400 razy w oleju sezamowym, tworząc w ten sposób emulsję. Uzyskano 4 grupy rozcieńczeń, w których stężenie treosulfanu wynosiło odpowiednio: 2, 1, 0,5 i 0,25mg/ml. W grupie kontrolnej zastosowano Aqua pro injectione 100-krotnie rozcieńczony olejem sezamowym.

2.5.1.4. Metody wprowadzenia treosulfanu

Emulsję roztworów cytostatyka oraz emulsję kontrolną (Aqua pro injectione) podano do jaj na dwa sposoby (Ryc. 8A i 8B). Łącznie uzyskano 10 grup zarodków:

- I TREO 0,25
- I TREO 0,5
- I TREO 1
- I TREO 2
- I kontrola
- II TREO 0,25
- II TREO 0,5
- II TREO 1
- II TREO 2
- II kontrola

Otwory iniekcyjne w skorupach zaklejono parafilmem.

2.5.1.5. Inkubacja zarodków

Wysterylizowane jaja poddano inkubacji przez 6 dni, w temperaturze 37,8°C i przy wilgotności 62-65%. W trzecim dniu wykonano kontrolę rozwoju zarodków w trakcie której odrzucano zamarłe zarodki w celu zabezpieczenia pozostałych zarodków przed kontaminacją. Następnie inkubację kontynuowano do 6 doby rozwoju zarodka.

2.5.1.6. Ocena przeżywalności zarodków

Po zakończeniu inkubacji policzono żywe i martwe zarodki uwzględniając osobniki odrzucone w trzecim dniu inkubacji. Na podstawie tych danych oszacowano procentową przeżywalność dla każdej z dziesięciu grup.

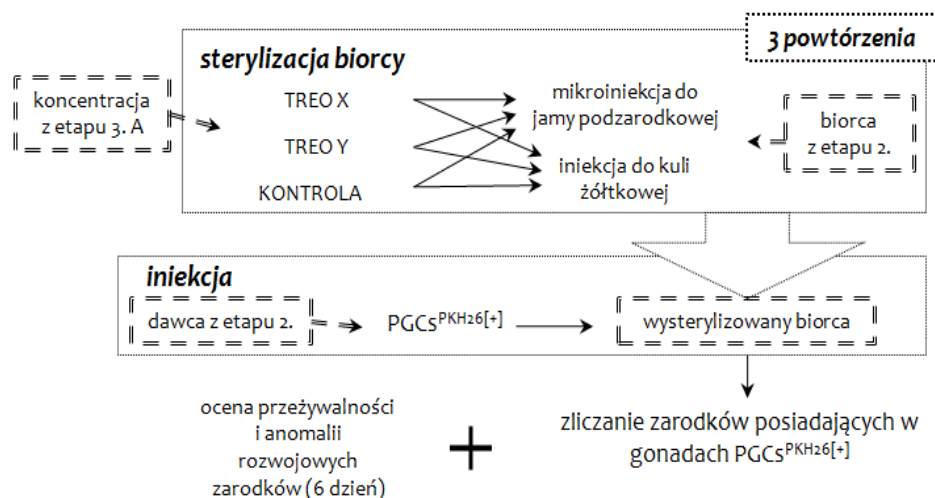
2.5.1.7. Izolacja i zliczanie PGCs dawcy

Gonady zostały wyizolowane w polu obserwacji mikroskopu stereoskopowego przy pomocy mikronarzędzi chirurgicznych i rozłokowane na płytce 96-dołkowej. Każdą parę gonad umieszczono w osobnej studziencie wypełnionej 300µl roztworu PBS[-]. Płytkę inkubowano przez 2 godziny w 37,8°C i 5% nasyceniu CO₂ wg metody Nakajima i wsp., (2011). Ma ona na celu oddzielenie PGCs od komórek somatycznych gonad i ich migrację do roztworu PBS[-] na zasadzie różnicy ciśnień osmotycznych. Po upływie dwóch godzin, zliczono PGCs dla każdej z grup, przy pomocy komory Bürker'a i mikroskopu odwróconego.

2.5.2. Wpływ sterylizacji zarodków biorców i iniekcja pierwotnych komórek płciowych dawców na przeżywalność i rozwój zarodków biorców.

2.5.2.1. Ogólny plan doświadczenia

Kolejne doświadczenie to połączenie sterylizacji i iniekcji zarodków (Ryc.9) oraz ich wpływ na zamieranie i zmiany rozwojowe zarodków. Wykonano 3 powtórzenia doświadczenia.



Ryc.9. Schemat doświadczenia trzeciego B.

2.5.2.2. Przygotowanie jaj biorców do sterylizacji

Jaja biorców na 2-3 dni przed steryлизacją osadzano w odpowiedniej pozycji celem ustabilizowania się tarczki zarodkowej - tępym końcem do góry bądź w pozycji horyzontalnej (patrz podpunkt 2.5.1.2). Po tym czasie jaja biorców dezynfekowano, nawiercono w tępym końcu ($\varnothing$ otworu - 1cm), bądź nakłuto w ostrym końcu i poddano procedurze sterylizacji treosulfanem, odpowiednio do tarczki zarodkowej lub do kuli żółtkowej.

2.5.2.3. Wybór dawki i sterylizacja zarodków biorców

Na podstawie wyników wcześniejszego doświadczenia wybrano dwie koncentracje treosulfanu: 0,5 i 0,25 mg/ml. Tak jak wcześniej, rozcieńczenia treosulfanu (stock: 100mg Treosulfanu/1ml Aqua pro injectione) podano do jaj pod postacią emulsji oleju sezamowego. Grupa kontrolna również została zainiekowana w formie emulsji Aqua pro injectione w oleju sezamowym (rozcieńczenie 100x). Zapłodnione jaja iniekowano 1-2 μ l każdego z roztworów pod tarczkę zarodkową lub wstrzyknięcie za pomocą strzykawki insulinówki 50 μ l roztworu do kuli żółtkowej. Jaja zaklejono parafilmem i poddano inkubacji.

2.5.2.4. Inkubacja jaj i przygotowanie zarodków biorców do iniekcji

Jaja dawców inkubowano przez 6 dni w temperaturze 37,8°C i przy wilgotności 62-65%. Po osiągnięciu przez zarodki stadium 28-29 wg H&H, jaja wybito i pozyskano z nich zarodki do izolacji PGCs.

Z kolei, potraktowane treosulfanem jaja biorców poddano 3,5-dniowej inkubacji do momentu uzyskania przez zarodki stadium 15-19 wg H&H. Inkubację zarodków dawców i biorców zsynchronizowano w taki sposób, że w momencie izolacji PGCs od 6 dniowych zarodków, druga grupa - czyli wysterylizowani biorcy komórek, znajdowali się w 15-19 stadium rozwojowe wg H&H. W tym stadium, po dezynfekcji powtórnie otwierano jaja zawierające sterylizowane zarodki, które poddano ocenie kondycji. Do iniekcji PGCs^{PKH26[+]} przeznaczono tylko żywe zarodki, nie wykazujące widocznych wad budowy. Zliczono zarodki martwe i określono przyczyny zamarcia (patrz dalej podpunkt 2.5.2.8.a.).

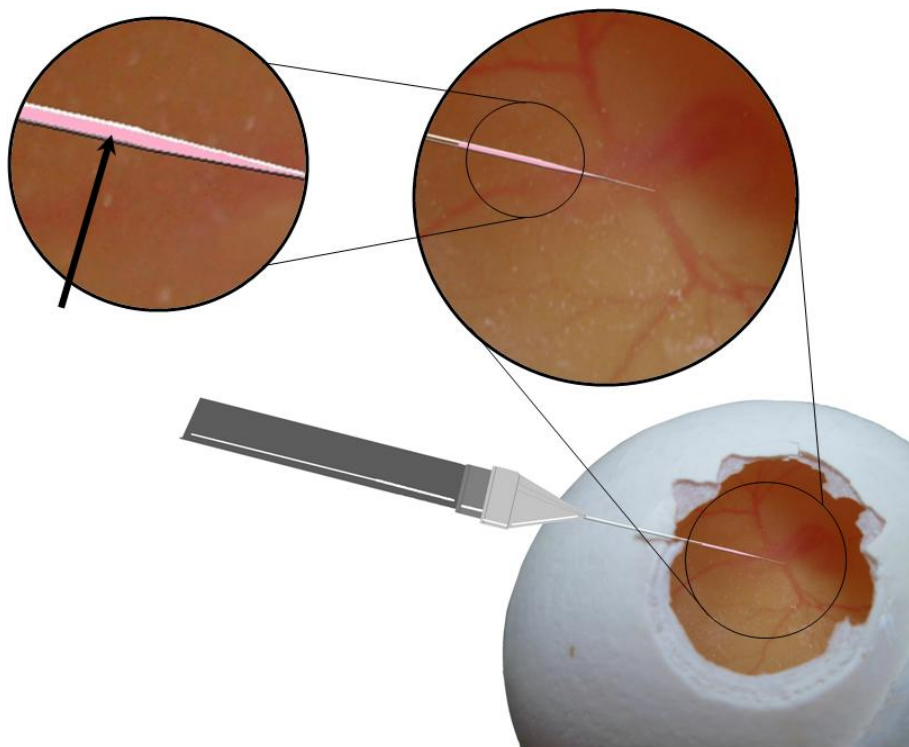
2.5.2.5. Izolacja PGCs i znakowanie fluorochromem PKH26

Komórki PGCs wyizolowano od 6-dniowych zarodków dawców według metody opisanej w punkcie 2.3.4. Uzyskaną zawiesinę wyznakowano fluorochromem PKH26 wg metodyki opisanej przez producenta. Następnie, PGCs^{PKH26[+]} zawieszono w 500µl medium OPTI-MEM® I i zliczono przy pomocy komory Bürker'a i mikroskopu odwróconego. Pożywka została uzupełniona o dodatek FBS (5%) i antybiotyk Pen-Strep (1%). Do momentu iniekcji komórki przetrzymywano w temperaturze 37,8°C i 5% nasyceniu CO₂.

2.5.2.6. Iniekcja PGCs^{PKH26[+]} do wysterylizowanych zarodków biorców i inkubacja zarodków

Jaja z wysterylizowanymi przy pomocy cytostatyka 3,5-dniowymi zarodkami biorcami ponownie otworzono (usunięto parafilm) i zdezynfekowano. Do iniekcji przeznaczono jaja tylko z centralnie ułożonymi zarodkami. Pozostałe zarodki (przesunięte, nieprawidłowo ułożone), które nie spełniły tego kryterium zostały odrzucone ze względu na utrudniony, a nawet niemożliwy dostęp do naczyń krwionośnych.

Wyznakowane PGCs^{PKH26[+]} zwirowano (2500 rpm; 5 min) i przeniesiono do świeżego medium OPTI-MEM® I. Do 100µl medium dodano 10µl FBS i 2µl antybiotyku Pen-Strep. Komórki w ilości 1-2 µl zawiesiny (średnia koncentracja dla trzech powtórzeń - 293 333/1ml) wprowadzano z pomocą mikromanipulatora do krwiobiegu wysterylizowanych zarodków biorców (Ryc.10). Po zakończeniu iniekcji jaja ponownie zabezpieczono parafilmem i inkubowano przez następne 3 dni w temperaturze 37,8°C i 62-65% wilgotności.



Ryc.10. Schemat iniekcji PGCs^{PKH26[+]} do krwiobiegu zarodków biorców. Strzałką zaznaczono mikroigłę zawierającą zawiesinę PGCs^{PKH26[+]}.

2.5.2.7. Detekcja fluorescencji w gonadach wysterylizowanych i iniekowanych PGCs^{PKH26[+]} zarodków

Fluorescencję detekowano w ten sam sposób, co w punkcie 2.4.7. Gonady pozyskano w 6-dobie od wszystkich żywych zarodków biorców. Każdą parę gonad umieszczono w osobnej kropli PBS na szkiełku podstawowym. Następnie, organy te delikatnie rozplaszczono przy pomocy szkiełka nakrywkowego. Pod mikroskopem odwróconym szukano komórek wykazujących fluorescencję w zakresie długości fal 551 do 567 nm. Zliczano tylko te embriony, w których gonadach widoczne były wyznakowane PKH26 pierwotne komórki płciowe w formie okrągłych, pojedynczych punktach o średnicy wynoszącej od 14 do 19µm bądź punktach w formie agregatów.

2.5.2.8. Ocena wpływu sterylizacji i iniekcji na zarodki

2.5.2.8.a. Przeżywalność zarodków i przyczyny wczesnego zamierania

Przeżywalność zarodków biorców zliczano osobno dla każdej z grup koncentracji oraz dla każdej z grup iniekowanych na różny sposób, tj. dla sterylizowanych do jamy podzarodkowej oraz do kuli żółtkowej. Określono

śmiertelność zarodków w 3,5 dniu po zabiegu sterylizacji oraz dla embrionów 6-dniowych, tj. po iniekcji PGCs^{PKH26[+]}. Wyznaczono dobę i prawdopodobny bezpośredni powód zamarcia (np. wylew, zawał, brak oznak rozwoju itd.).

2.5.2.8.b. Patologie rozwojowe u zarodków 6-dniowych

Spośród zarodków biorców, które przeżyły do dnia detekcji fluorescencji policzono i oznaczono w 6-dniu, embriony z widocznymi patologiami budowy. Wady rozwojowe oznaczono osobno dla każdego rozcieńczenia i dla każdej z metod wprowadzenia treosulfanu - pod tarczkę zarodkową lub do kuli żółtkowej.

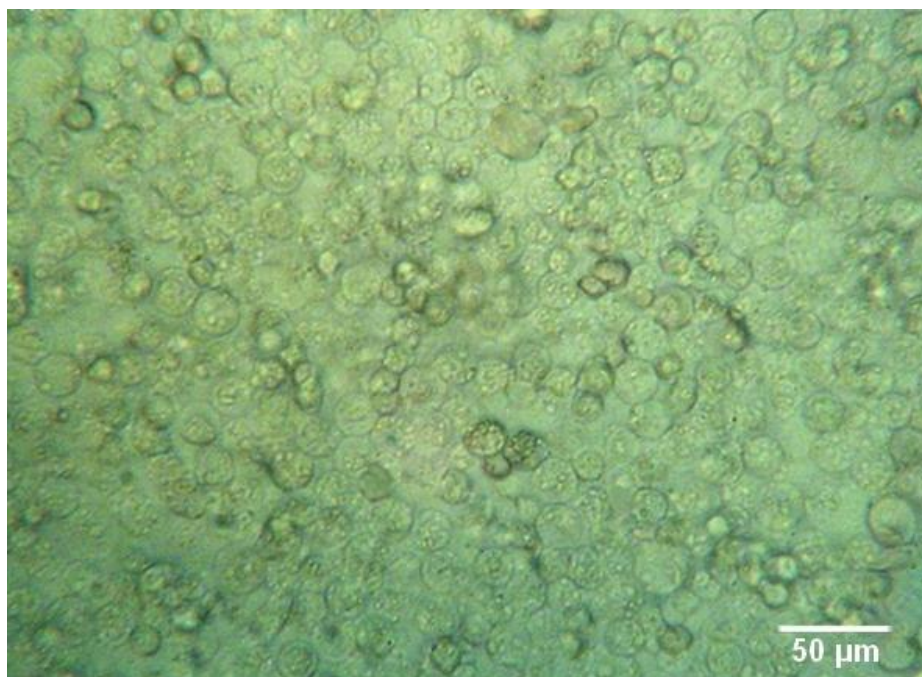
2.6. ANALIZA STATYSTYCZNA

W doświadczeniach, do obliczeń statystycznych wykorzystano program statystyczny SAS Enterprise Guide 4.3. Z pomocą programu wykonano analizy wariancji jedno- i wieloczynnikowe, analizy kontyngencji z wykorzystaniem testu Chi-kwadrat oraz korelację prostoliniową Pearsona. Poszczególne zastosowanie tych analiz oraz użycie testów post-hoc opisano w kolejnych rozdziałach.

3. WYNIKI

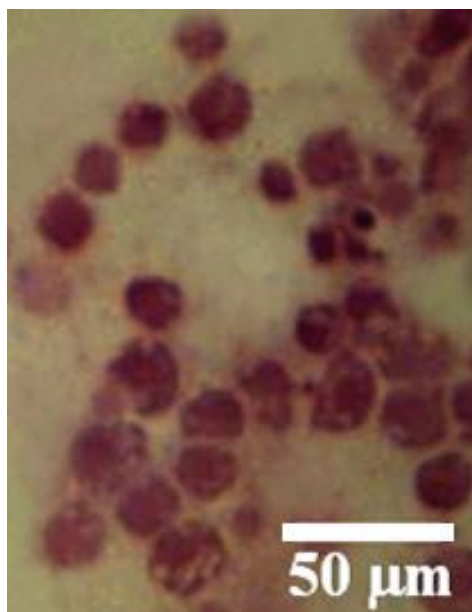
3.1. OPTYMALIZACJA SPOSOBU IZOLACJI PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH Z GONAD 6-DNIOWYCH ZARODKÓW KURZYCH

Wyizolowane w trakcie badań komórki (Fot.3) posiadały cechy morfologiczne charakterystyczne dla pierwotnych komórek płciowych, tzn. okrągły kształt, liczne ziarnistości w cytoplazmie, średnicę wynoszącą od 14 do 19 μm , duże jądro komórkowe. Łącznie wyizolowano $7,118 \times 10^6$ pierwotnych komórek płciowych (średnio $5,932 \times 10^5$) z czego $3,33 \times 10^6$ komórek pochodziło od kurcząt R (średnio $5,550 \times 10^5$), a $3,788 \times 10^6$ od ZK (średnio $6,313 \times 10^5$). Uzyskane różnice nie były istotne statystycznie ($P > 0,05$).



Fot.3. Pierwotne komórki płciowe wyizolowane z gonady; Axiovert 40 CFL Zeiss

Zbadano także zachowanie się komórek poddanych barwieniu PAS, mającym na celu uwidocznienie w komórkach materiału zapasowego w postaci glikogenu. Wybarwione komórki PGCs przedstawiono na zdjęciu 4.



Fot.4. Identyfikacja PGCs (reakcja PAS); MN800 FL OPTA-TECH

Pierwotne komórki płciowe izolowano z gonad trzema różnymi sposobami - poprzez mechaniczne rozdrobnienie (A), nadtrawienie trypsyną-EDTA (B) oraz poprzez wolną migrację komórek w roztworze PBS z nienaruszonych gonad (C). Ostatnia z wyżej wymienionych grup stanowiła kontrolę. Łącznie wyizolowano 144 gonady pochodzące od 72 zarodków kurzych. Uzyskano łącznie 1,46 mln komórek. W tabeli 4. przedstawiono wyniki poszczególnych metod izolacji PGCs. Największą przeżywalność (76,17%) i liczbę żywych PGCs zanotowano w grupie kontrolnej. Najniższą przeżywalnością komórek cechowała się grupa, gdzie gonady nadtrawiono roztworem trypsyny-EDTA (71,55%). Najmniej komórek uzyskano z gonad rozdrobnionych mechanicznie. Uzyskane różnice pomiędzy grupami okazały się być istotne statystycznie ($P < 0,05$).

Zachowanie się pierwotnych komórek płciowych dawcy oceniono także pod kątem tendencji do tworzenia agregatów komórkowych. Jedynie PGCs izolowane metodą B nie utworzyły skupisk w postaci agregatów komórkowych, a otrzymany materiał cechował się wysoką czystością i jednorodnością. Pozostałe metody A i C charakteryzowały się obecnością agregatów, a wykonany test Chi-kwadrat potwierdził iż metoda izolacji PGCs wpływa istotnie na pojawienie się konglomeratów w tych dwóch grupach ($P < 0,05$). Konglomeraty z pierwotnych komórek płciowych kury izolowanych metodą A przedstawiono na zdjęciu 5.

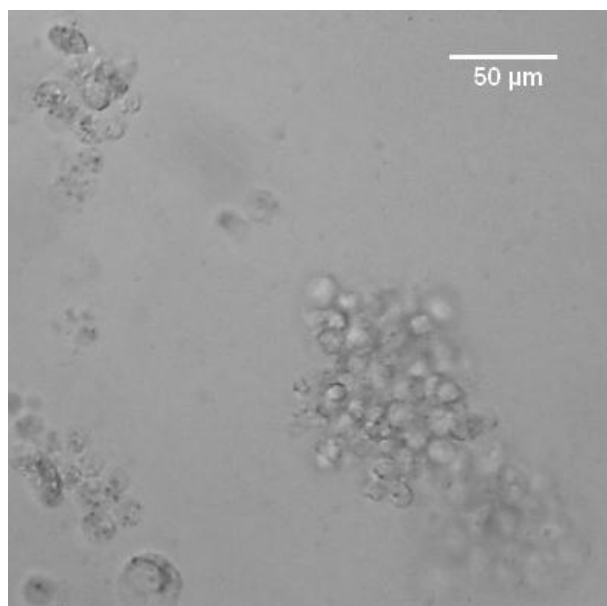
Tab. 4. Wpływ różnych metod izolacji PGCs na liczbę i przeżywalność komórek.

metoda	n	liczba wyizolowanych komórek PGCs	$\bar{x}$	SD	agregaty
A	24	żywych w 1ml martwych w 1 ml razem przeżywalność [%]	93333,33 ^c 35333,33 128666,67 ^c 72,54	9,22	tak*
B	24	żywych w 1ml martwych w 1 ml razem przeżywalność [%]	114000,00 ^b 45333,33 159333,33 ^b 71,55	9,29	nie*
C (kontrola)	24	żywych w 1ml martwych w 1 ml razem przeżywalność [%]	151333,33 ^a 47333,33 198666,67 ^a 76,17	8,03	tak*

$\bar{x}$ - wartości średnie; SD - odchylenie standardowe;

a, b, c - wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie dla $P < 0,05$

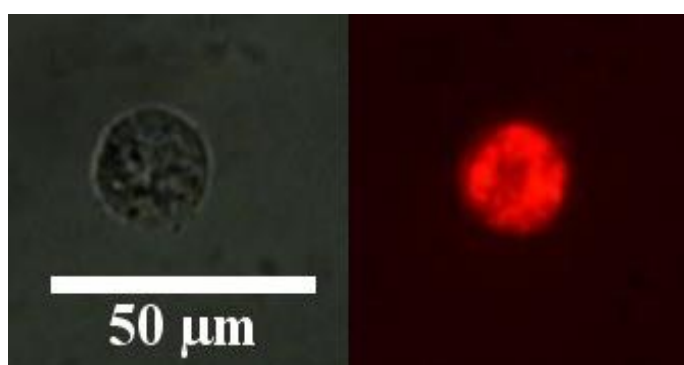
* - różnice istotne statystycznie dla $P < 0,05$



Fot.5. Agregaty komórkowe w grupie A, PGCs izolowano poprzez mechaniczne rozdrobnienie gonad; Axiovert 40 CFL Zeiss

3.2. BADANIE WPŁYWU DAWCY I BIORCY KOMÓREK, NA DETEKCJĘ EGZOGENNYCH PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH W GONADACH ZARODKÓW BIORCÓW

Do izolacji PGCs wykorzystano 180 zarodki Ross 308 oraz 180 zarodki zielononózek kuropatwianych. Na podstawie wyników etapu pierwszego komórki izolowano metodą nadtrawiania gonad roztworem trypsyny-EDTA. Aby możliwa była obserwacja zachowania się uzyskanych PGCs dawcy, wyznakowano je fluorochromem PKH26 (Fot. 6) i wprowadzono do 143 zarodków Ross 308 oraz 162 zarodków zielononózki kuropatwianej.



Fot. 6. Pierwotna komórka płciowa wyznakowana PKH26 w świetle białym (lewa) oraz ultrafioletowym (prawa); Axiovert 40 CFL Zeiss

3.2.1. Przeżywalność niewyznakowanych lub wyznakowanych PKH26 pierwotnych komórek płciowych w hodowli *in vitro*

W pracy oceniono także zachowanie się pierwotnych komórek płciowych podczas krótkoterminowej hodowli *in vitro*. Ocenę przeżywalności PGCs w dniu izolacji oraz po trzech dniach hodowli *in vitro* przeprowadzono z wykorzystaniem błękitu trypanu. Wyniki dla przeżywalności PGCs w dniu izolacji przedstawiono w tabeli 5., natomiast po trzech dniach hodowli *in vitro* w tabeli 6.

Łącznie wyizolowano 3 330 000 PGCs z zarodków Ross 308 i 3 788 000 z zielononózki kuropatwianej, jednak różnice te nie były istotne statystycznie ($P > 0,05$). Fluorochromem wyznakowano odpowiednio 2 696 000 i 2 230 000 komórek. Pozostałą część przeznaczono do krótkoterminowej hodowli *in vitro*. W dniu izolacji, w przypadku PGCs niewyznakowanych PKH26, wyższą przeżywalnością cechowały się komórki pochodzące od zielononózek kuropatwianych i wynosiła ona 66,31 %. Natomiast w odniesieniu do PGCs wyznakowanych PKH26 większą przeżywalność zaobserwowano w grupie komórek izolowanych z zarodków Ross 308 (53,68 %). Jednak uzyskane wyniki nie znalazły potwierdzenia statystycznego ($P > 0,05$).

Tab. 5. Przeżywalność niewyznakowanych [-] i wyznakowanych [+] PGCs pochodzenia Ross 308 i zielononóżka kuropatwiana w dniu ich izolacji.

dawca	przeżywalność PGCs ^{PKH26[-]} %		przeżywalność PGCs ^{PKH26[+]} %	
	$\bar{x}$ SD		$\bar{x}$ SD	
R		64,14 ±21,25		53,68 ±15,82
ZK		66,31 ±27,74		48,92 ±16,06

$\bar{x}$ - wartości średnie; SD - odchylenie standardowe

R - Ross 308; ZK - zielononóżka kuropatwiana

Po trzech dniach hodowli *in vitro* całkowita liczba pierwotnych komórek płciowych niewyznakowanych wynosiła 420 000 dla Ross 308 i 443 000 dla zielononóżki kuropatwianej, natomiast liczba komórek wyznakowanych PKH26 wyniosła odpowiednio 1 670 000 i 962 000 PGCs. Przeżywalność PGCs niewyznakowanych fluorochromem po trzech dniach hodowli w warunkach *in vitro* była bardzo zbliżona u obu grup i wynosiła 86,63 % (wzrost o 22,49 %) dla Ross 308 i 86,34 % (wzrost o 20,03 %) dla zielononózek kuropatwianych. W przypadku komórek niewyznakowanych uzyskano odpowiednio 62,87 % (wzrost o 9,19 %) oraz 73,54 % (wzrost o 24,62 %) jednak różnice te nie były statystycznie istotne ($P > 0,05$).

Tab. 6. Przeżywalność niewyznakowanych [-] i wyznakowanych [+] PGCs pochodzenia Ross 308 i zielononóżka kuropatwiana po trzech dniach hodowli *in vitro*.

dawca	przeżywalność PGCs ^{PKH26[-]} %		przeżywalność PGCs ^{PKH26[+]} %	
	$\bar{x}$ SD		$\bar{x}$ SD	
R		86,63 ±6,98		62,87 ±24,07
ZK		86,34 ±9,49		73,54 ±15,50

$\bar{x}$ - wartości średnie; SD - odchylenie standardowe

R - Ross 308; ZK - zielononóżka kuropatwiana

Oceniono także wpływ samego czynnika PKH26 na zachowanie się PGCs. Przeżywalność PGCs wyznakowanych fluorochromem przedstawiono w tabeli 7. W pierwszym dniu hodowli *in vitro* wyższą przeżywalnością odznaczały się PGCs niewyznakowane PKH26, jednak wynik ten nie był istotny statystycznie ($P > 0,05$). Podobną tendencję stwierdzono po trzech dniach hodowli *in vitro*. Jednak tym razem wyższa przeżywalność (86,48%) w grupie komórek

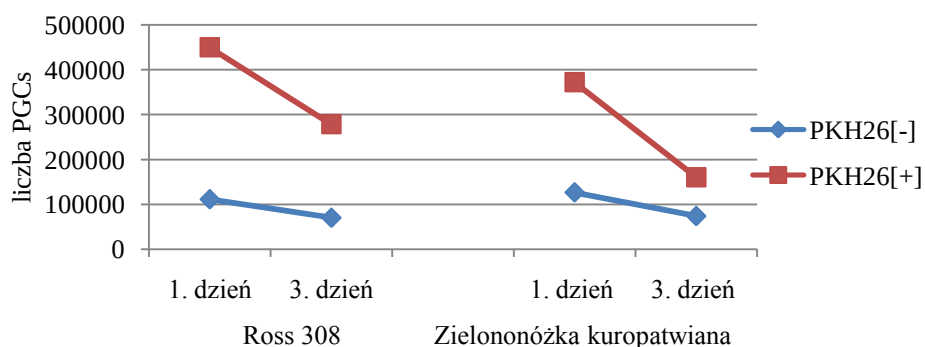
niewyznakowanych PKH26, w porównaniu do wyznakowanych (68,20%) różniła się statystycznie istotnie ($P < 0,05$).

Tab. 7. Przeżywalność niewyznakowanych [-] i wyznakowanych [+] PGCs w dniu izolacji i po trzech dniach hodowli *in vitro*.

PKH26	dzień	przeżywalność PGCs [%]	
+	1.	$\bar{x}$	51,04 ^a
		SD	±23,59
-	1.	$\bar{x}$	65,22 ^a
		SD	±15,40
+	3.	$\bar{x}$	68,20 ^a
		SD	±20,09
-	3.	$\bar{x}$	86,48 ^b
		SD	±7,94

a,b - wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie: $P < 0,05$

$\bar{x}$ - wartości średnie; SD - odchylenie standardowe



Ryc.11. Wpływ wyznakowania PKH26 na liczbę PGCs podczas krótkoterminowej hodowli *in vitro*.

Na rycinie 11 porównano liczbę komórek wyznakowanych i nie wyznakowanych podczas 3 dniowej hodowli. Niezależnie od sposobu postępowania stwierdzono spadek liczby komórek. Przyjmując, iż liczba PGCs (niewyznakowanych i wyznakowanych fluorochromem) w pierwszym dniu była równa 100%, uzyskano następujące zmiany w ilości PGCs w trzecim dniu hodowli:

- dla komórek izolowanych z zarodków Ross 308:
36,94% spadek całkowitej ilości PGCs^{PKH26[-]} (100% → 63,06%),
38,06% spadek całkowitej ilości PGCs^{PKH26[+]} (100% → 61,94%),
- oraz dla komórek izolowanych z zarodków zielononóżki kuropatwanej:

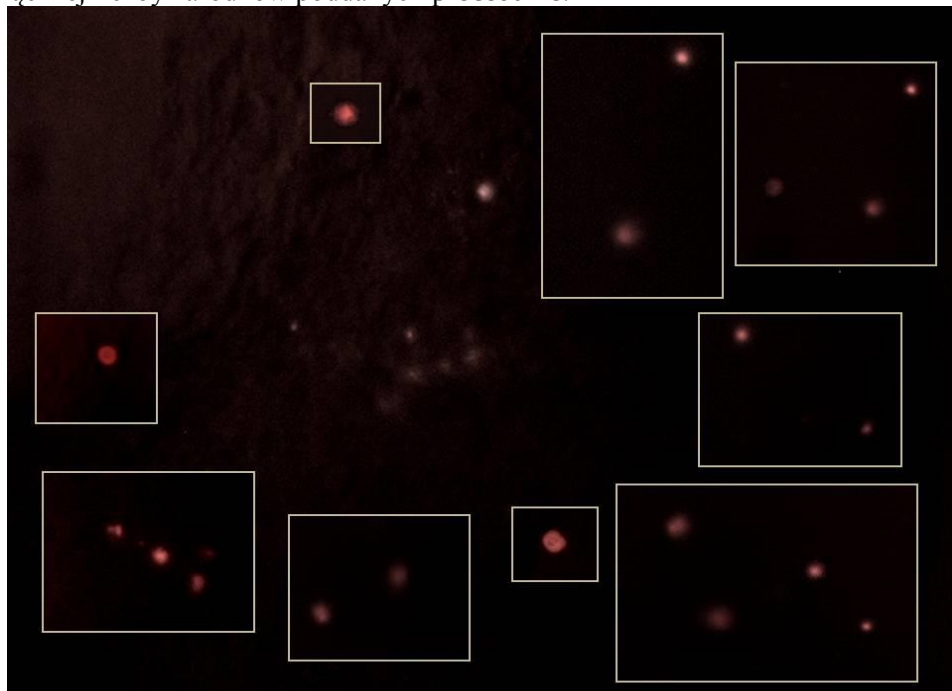
41,53% spadek całkowitej ilości PGCs^{PKH26[-]} (100% → 58,47%),

56,86% spadek całkowitej ilości PGCs^{PKH26[+]} (100% → 43,14%).

Jeśli dane te analizujemy niezależnie od genotypu dawców komórek, to liczba wyznakowanych fluorochromem PGCs podczas trzydniowej hodowli *in vitro* zmniejszyła się o 46,57% (100% → 53,43%), natomiast niewyznakowanych o 39,40% (100% → 60,60%).

3.2.2. Detekcja fluorescencji w gonadach zarodków biorców

Gonady zarodków biorców sprawdzono pod kątem obecności wprowadzonych, wyznakowanych fluorochromem PKH26 pierwotnych komórek płciowych. Występowanie w obrębie gonad punktów wielkości 14 do 19 μm i wykazujących fluorescencję w zakresie fal 551-567 nm, świadczyło o obecności egzogennych PGCs (Fot. 7). Przeżywalność zarodków po iniekcji określono na podstawie procentowego udziału zarodków żywych w stosunku do łącznej liczby zarodków poddanych procedurze.



Fot. 7. Powiększenie gonady zielononózki kuropatwianej i wybranych jej fragmentów (tło 200x; małe zdjęcia 400x) z widocznymi wyznakowanymi PKH26 pierwotnymi komórkami płciowymi pochodzącymi od dawców Ross 308; Axiovert 40CFL Zeiss

W tabeli 8. przedstawiono wyniki dotyczące wpływu układu dawca/biorca na procent zarodków biorców z egzogennymi PGCs. Największy procent zarodków posiadających egzogenne PGCs 54,50% ($P < 0,01$) odnotowano w grupie, gdzie dawcą komórek był Ross 308, a biorcą zielononózka

kuropatwana. Najmniejszy procent zarodków z widocznymi egzogennymi PGCs 3,30% ($P < 0,01$) zaobserwowano w grupie, gdzie dawcą komórek była zielononóżka kuropatwana, a biorcą Ross 308, podobnie (8,30%) w grupie gdzie Ross 308 był dawcą/biorcą. Homogenna kombinacja ZK/ZK charakteryzowała się pośrednią wartością (19,10%). Układ genotypów nie miał wpływu na przeżywalność zarodków ($P > 0,05$).

Tab. 8. Wpływ układu dawca/biorca na przeżywalność zarodków po iniekcji oraz detekcję fluorescencji w gonadach zarodków biorców

dawca→biorca	przeżywalność zarodków w grupie kontrolnej - nieiniekowanej [%]*		przeżywalność iniekowanych zarodków [%]		% zarodków z widocznymi PGCs ^{PKH26[+]}
	n	$\bar{x}$ SD	n	$\bar{x}$ SD	$\bar{x}$ SD
R→R	28	100,00 ±0,00	78	92,30 ±3,40	8,30 ^B ±0,13
ZK→ZK	30	96,70 ±5,77	73	93,20 ±8,82	19,10 ^{AB} ±1,70
ZK→R	30	96,70 ±5,77	65	93,80 ±2,59	3,30 ^B ±0,27
R→ZK	30	100,00 ±0,00	89	86,50 ±3,34	54,50 ^A ±1,40

A, B - wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie: $P < 0,01$

$\bar{x}$ - wartości średnie; SD - odchylenie standardowe

R- Ross 308; ZK - zielononóżka kuropatwana

* - tylko biorca z wydrążonym otworem iniekcyjnym w skorupie jaja

Obliczone współczynniki korelacji prostopadłej Pearsona między procentem zarodków z widocznymi, wyznakowanymi PGCs, a liczbą martwych zarodków oraz przeżywalnością były odpowiednio wysoko istotne oraz istotne statystycznie. Zależności odnoszące się do liczby zarodków martwych były wysokie wg skali Guilforda, a współczynnik korelacji przyjął wartość dodatnią. Z kolei zależności dotyczące przeżywalności były umiarkowane, a współczynnik korelacji przyjął wartość ujemną (Tab. 9).

Tab. 9. Korelacja Pearsona pomiędzy procentem zarodków z widocznymi egzogennymi PGCs, a przeżywalnością tych zarodków.

		zarodki żywe	zarodki martwe	przeżywalność [%]
% zarodków z widocznymi PGCs PKH26[-]	WK	0,38970	0,72240**	-0,65148*

* - współczynnik korelacji istotny statystycznie; $P < 0,05$

** - współczynnik korelacji wysoko istotny statystycznie; $P < 0,01$

Wpływ iniekcji na przeżywalność zarodków biorców przedstawiono w tabeli 10. W skorupach jaj z obu grup wykonano otwory iniekcyjne, jednak iniekcji dokonano jedynie w grupie doświadczalnej. Wyższa przeżywalnością (98,31%) cechowały zarodki z grupy kontrolnej, nie poddane iniekcji, w porównaniu do tych, którym wprowadzono do krwiobiegu wyznakowane pierwotne komórki płciowe (91,15%). Różnica (7,16%) została potwierdzona statystycznie istotnie ($P < 0,01$).

Tab. 10. Wpływ iniekcji na przeżywalność zarodków biorców

procedura	liczba zarodków	zarodki żywe	zarodki martwe	przeżywalność zarodków [%]	
iniekcja	305	278	27	$\bar{x}$ SD	91,15 ^B ±5,38
brak iniekcji (kontrola)	118	116	2	$\bar{x}$ SD	98,31 ^A ±3,98

A, B - wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie: $P < 0,01$

$\bar{x}$ - wartości średnie; SD - odchylenie standardowe

3.3. METODA STERYLIZACJI ZARODKÓW BIORCÓW, POPRZEDZAJĄCA INIEKCJĘ EGZOGENNYCH PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH I JEJ WPŁYW NA PRZEŻYwalność I ROZWÓJ ZARODKÓW BIORCÓW

3.3.1. Wybór dawki iniekowanego do jaja treosulfanu

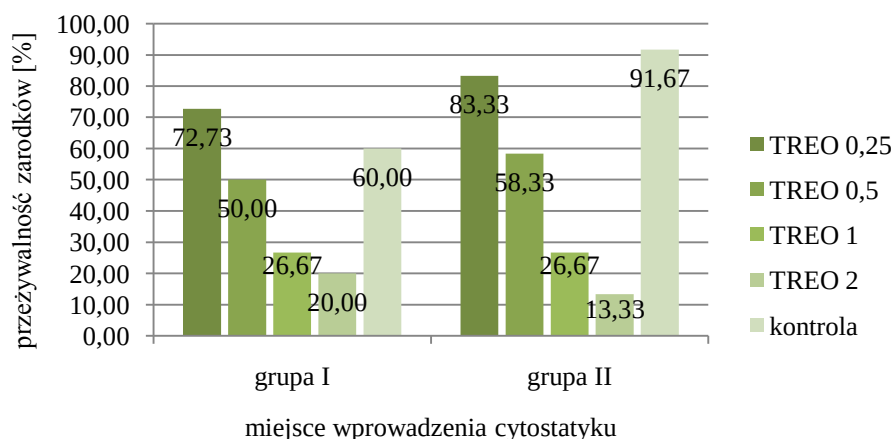
W tej części doświadczenia, sprawdzono zachowanie się pierwotnych komórek płciowych dawcy poddanych działaniu substancji sterylizującej - treosulfanu. W tym celu wykorzystano 127 zarodków ZK, z czego sterylizacji poddano 105 zarodków, a 22 stanowiły grupę kontrolną. Ogólna przeżywalność wynosiła 47,24%. Spośród wszystkich 127 zarodków, 61 było iniekowanych pod tarczkę zarodkową, a 66 do kuli żółtkowej. Biorąc pod uwagę różne

koncentracje cytostatyka, zainiekowano 23, 22, 30 i 30 zarodków odpowiednio roztworami 0,25, 0,5, 1 i 2mg/ml.

Wyniki testu Chi-kwadrat (Tab. 11) wskazują, iż istnieje bardzo wysoka statystycznie zależność między metodą sterylizacji, a przeżywalnością zarodków ($P < 0,001$). W obrębie grup doświadczalnych najwyższą przeżywalność odnotowano dla zarodków sterylizowanych pod tarczkę zarodkową (72,73%) oraz do kuli żółtkowej (83,33%) treosulfanem o koncentracji 0,25mg/ml. Wraz ze wzrostem stężenia podawanego cytostatyka, malała przeżywalność zarodków, osiągając najniższe wartości w grupie, gdzie stężenie treosulfanu wynosiło 2mg/ml (20,00% dla grupy I i 13,33% dla grupy II) (Ryc.12).

Tab. 11. Wpływ iniekcji treosulfanu na przeżywalność zarodków (test Chi-kwadrat).

Statystyka	Wartość	Prawd.
Chi-kwadrat	36,3975	<,0001
Chi- kwadrat ilorazu wiarygodności	39,8738	<,0001



Ryc.12. Wpływ iniekcji treosulfanu na przeżywalność zarodków.

I - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do jamy podzarodkowej

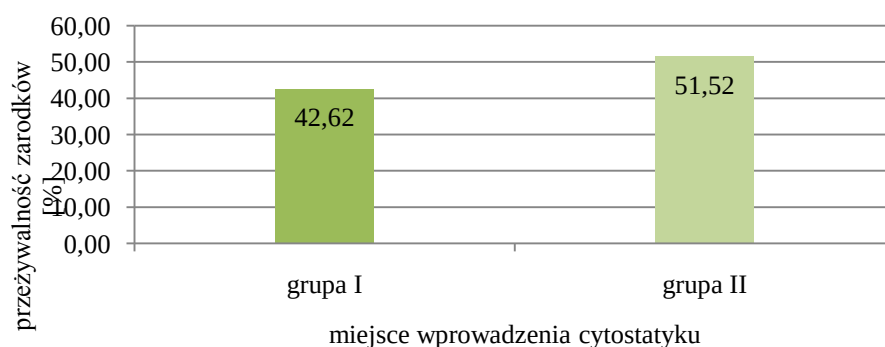
II - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do kuli żółtkowej

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

Przeprowadzone analizy kontyngencji wykazały brak istotnych zależności ($P > 0,05$) pomiędzy zamieralnością zarodków, a miejscem iniekcji treosulfanu, bez podziału na koncentracje (Tab. 12). Śmiertelność zarodków w zależności od miejsca iniekcji treosulfanu przedstawiono na wykresie 13.

Tab. 12. Wpływ miejsca iniekcji treosulfanu na przeżywalność zarodków (test Chi-kwadrat) .

Statystyka	Wartość	Prawd.
Chi-kwadrat	1,0057	0,3159
Chi-kw. ilorazu wiarygodn.	1,0073	0,3155



Ryc.13. Wpływ miejsca iniekcji treosulfanu na przeżywalność zarodków.

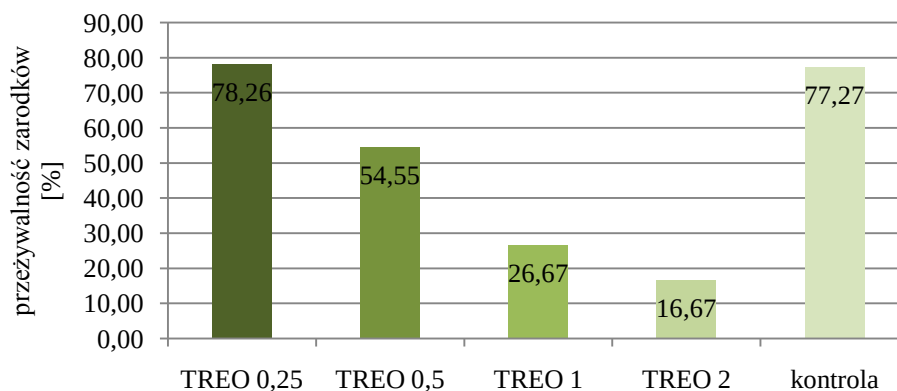
I - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do jamy podzarodkowej

II - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do kuli żółtkowej

W oparciu o wyniki testu Chi-kwadrat, wykazano, iż istnieje bardzo wysoka statystycznie zależność pomiędzy zamieralnością zarodków, a koncentracją podawanego roztworu treosulfanu, niezależnie od miejsca jego iniekcji (Tab. 13). Najwyższą przeżywalność (78,26%) odnotowano w grupie, gdzie stosowano największe rozcieńczenia cytostatyka. Grupa kontrolna charakteryzowała się nieco niższą przeżywalnością (77,27%). Największą zamieralność oznaczono w grupie z najwyższą koncentracją treosulfanu równą 2mg/ml (16,67%). Wraz ze zwiększającym się stężeniem treosulfanu malała przeżywalność zarodków ($P < 0,001$). Wykres 14. pokazuje schodkowy układ tej zależności.

Tab. 13. Wpływ rozcieńczenia treosulfanu na przeżywalność zarodków (test Chi-kwadrat) .

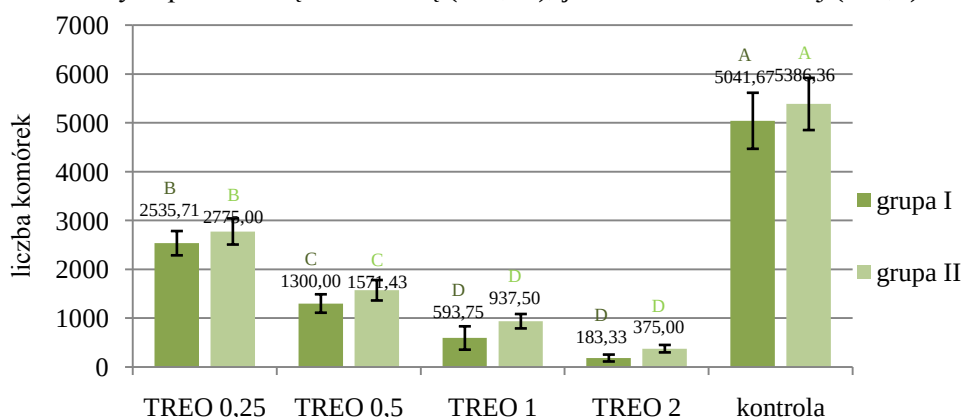
Statystyka	Wartość	Prawd.
Chi-kwadrat	33,6582	<,0001
Chi-kw. ilorazu wiarygodn.	35,8612	<,0001



Ryc.14. Wpływ koncentracji treosulfanu na przeżywalność zarodków.

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

Liczbę pierwotnych komórek płciowych po sterylizacji przedstawiono na wykresie 15. Najwięcej PGCs w obrębie grup doświadczalnych uzyskano przy koncentracji 0,25mg/ml, była one jednak o około 50% mniejsza (2535,71 – 2775,0), w porównaniu z grupą kontrolną (5041,67 – 5386,36). Najmniej komórek uzyskano w przypadku rozcieńczenia 50x, zarówno w grupie jaj iniekowanych pod tarczkę zarodkową (183,33), jak i do kuli żółtkowej (375,0).



Ryc.15. Wpływ kombinacji miejsca iniekcji i koncentracji treosulfanu na liczbę przetrwałych PGCs w gonadach 6-dniowych zarodków.

I - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do jamy podzarodkowej

II - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do kuli żółtkowej

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

A, A, B, B, C, C, D, D - wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie: $P < 0,001$

Analiza wariancji przedstawiona w tabeli 14. wykazała, iż na zachowanie się endogennych PGCs w gonadach zarodków biorców mają wpływ zarówno metoda wprowadzenia ($P = 0,0119$) treosulfanu do zarodka, jak i koncentracja wprowadzanego roztworu ($P < 0,0001$). Wynik testu dla interakcji pomiędzy badanymi czynnikami doświadczalnymi, tj. metody wprowadzania i zastosowanego rozcieńczenia, był nieistotny ($P = 0,9888$).

Tab. 14. Analiza wariancji wpływu miejsca iniekcji i koncentracji treosulfanu na liczbę przetrwałych PGCs w gonadach 6-dniowych zarodków .

Źródło	Suma kwadratów	Średnia kwadratów	F	Pr. > F
metoda	888717,1	888717,1	6,83	0,0119
koncentracja	174673867,0	43668466,8	335,55	<,0001
metoda*koncentracja	40328,0	10082,0	0,08	0,9888

Wyniki testu Scheffe'a przedstawiono w tabeli 15. Test ten potwierdził istotne różnice liczby PGCs, w zależności od metody podania treosulfanu (pod tarczkę zarodkową lub do kuli żółtkowej). Treosulfan iniekowany pod tarczkę zarodkową wyeliminował endogenne PGCs w większym stopniu niż cytostatyk podany do kuli żółtkowej, odpowiednio 2297,0 lub 3014,71 komórek.

Tab. 15. Wpływu metody podania treosulfanu na liczbę PGCs w gonadach 6-dniowych zarodków (test Scheffe'a)

metoda	$\bar{x}$
grupa I	2297,00 ^b
grupa II	3014,71 ^a

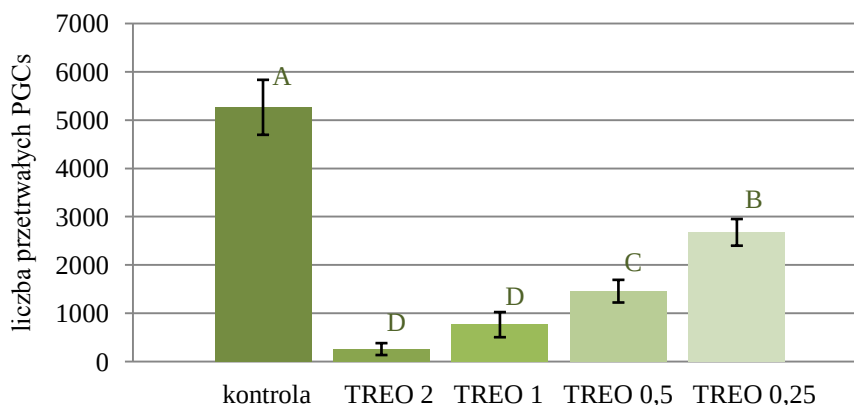
I - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do jamy podzarodkowej

II - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do kuli żółtkowej

a, b - wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie: $P < 0,05$

$\bar{x}$ - wartości średnie

Wyniki testu Scheffe'a dla różnych stężeń treosulfanu, niezależnie od sposobu podania, przedstawiono na wykresie 16. Jedynie pomiędzy koncentracjami 2 i 1mg/ml nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic, pozostałe przypadki różniły się istotnie ($P < 0,001$).



Ryc.16. Wykres przedstawiający zależność pomiędzy liczbą przetrwałych PGCs a koncentracją treosulfanu.

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

A, B, C, D- wartości w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się statystycznie: $P < 0,001$

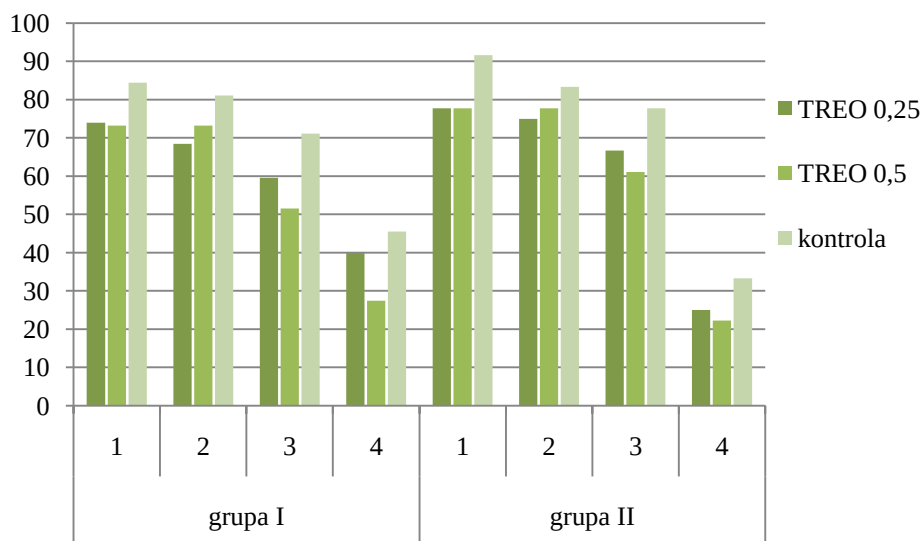
Zdjęcia wyizolowanych, przetrwałych po sterylizacji pierwotnych komórek płciowych zebrano w postaci tabeli 24. i umieszczono w rozdziale 6.

3.3.2. Sterylizacja zarodków biorców i iniekcja pierwotnych komórek płciowych, oraz ich wpływ na przeżywalność zarodków

W niniejszej pracy zbadano także jak zachowują się PGCs dawcy wprowadzone do wysterylizowanych zarodków biorców. Oceniono przeżywalność zarodków biorców i zdolność egzogennych wyznakowanych PKH26 PGCs do wbudowywania się w ich gonady. Na podstawie wyników poprzedniego etapu do sterylizacji wybrano koncentracje treosulfanu 0,5 i 0,25mg/ml. Cytostatyk wprowadzono pod komórki tarczki zarodkowej lub do kuli żółtkowej (Ryc. 17). W sumie, wysterylizowano 208 zarodków pochodzących od zielononózki kuropatwianej, stanowiących biorcę PGCs. Do izolacji PGCs wykorzystano 90 zarodków dawców PGCs - kurcząt Ross 308. PGCs, pozyskane od tych zarodków wykryto w 67 zarodkach biorców.

Grupa kontrolna(Ryc.17) charakteryzowała się najwyższą przeżywalnością zarodków (84,44% w grupie I i 91,67% w grupie II), największą liczbą biorców prawidłowo ułożonych (81,11% w grupie I i 83,33% w grupie II), najwyższą liczbą zarodków, które przeżyły iniekcję (71,11% w grupie I i 77,78% w grupie II) oraz najwyższą liczbą zarodków, u których odnotowano obecność egzogennych PGCs wyznakowanych fluorochromem (45,56% w grupie I i 33,33% w grupie II). Spośród grup TREO 0,25 i TREO 0,5 najwięcej zarodków

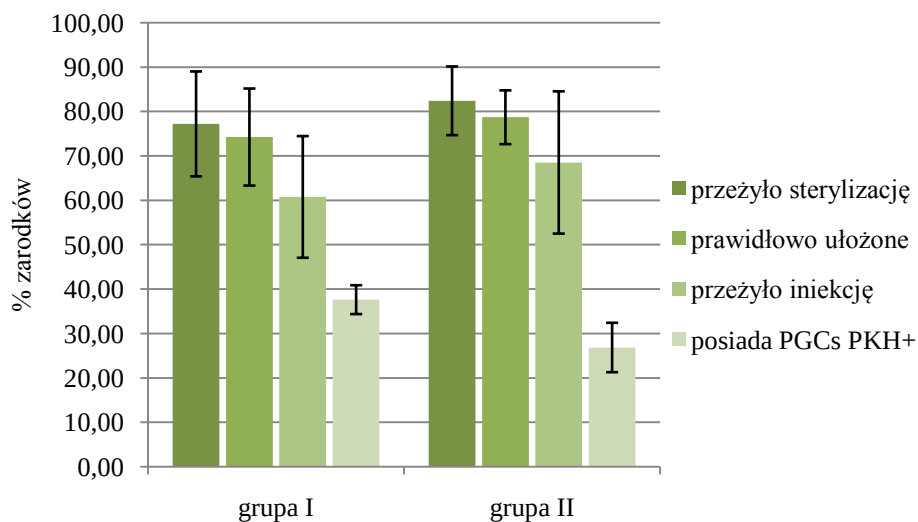
biorców, u których wykryto wprowadzone egzogenne PGCs wyznakowane fluorochromem uzyskano w przypadku podania większego rozcieńczenia treosulfanu pod tarczkę zarodkową (39,90%), a najmniejsze (22,22%) w przypadku treosulfanu rozcieńczonego mniejszego iniekowanego do kuli żółtkowej. Jednak wszystkie różnice okazały się być statystycznie nieistotne ($P > 0,05$).



Ryc.17. Wpływ iniekcji treosulfanu pod tarczkę zarodkową (grupa I) lub do kuli żółtkowej (grupa II) na przeżywalność zarodków biorców oraz obecność egzogennych PGCs wyznakowanych PKH26.

- 1 - zarodki, które przeżyły sterylizację treosulfanem
- 2 - zarodki prawidłowo ułożone (zakwalifikowane do dalszej iniekcji)
- 3 - zarodki, które przeżyły iniekcję
- 4 - zarodki u których stwierdzono obecność wprowadzonych PGCs^{PKH26[+]}
- I - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do jamy podzarodkowej
- II - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do kuli żółtkowej
- kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

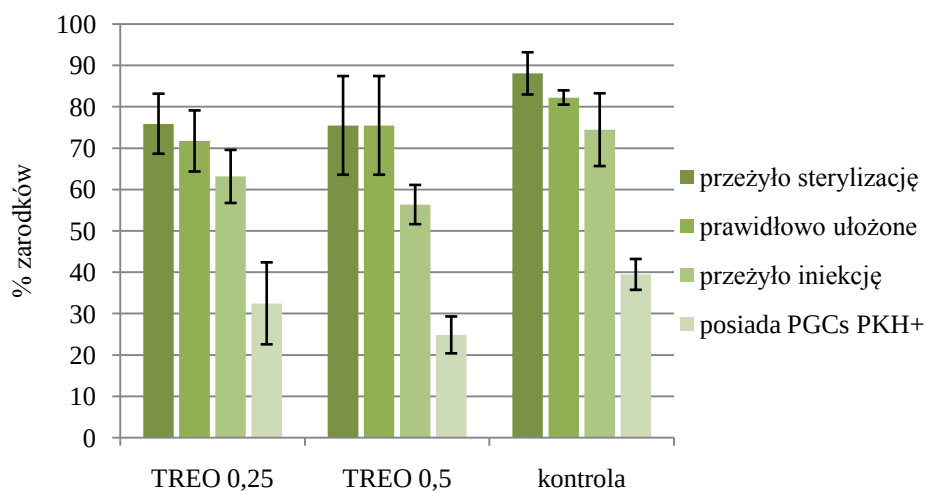
W celu lepszego zobrazowania powyższych wyników przeżywalności zarodków oraz detekcji fluorescencji pogrupowano je pod kątem metody iniekcji oraz pod kątem zastosowanych koncentracji - odpowiednio wykresy 18 i 19. Jednak nie odnotowano różnic istotnych statystycznie ($P > 0,05$).



Ryc.18. Wpływ różnych metod iniekcji treosulfanu (pod tarczkę zarodkową lub do kuli żółtkowej) na przeżywalność zarodków biorców oraz obecność egzogennych PGCs wyznakowanych PKH26.

I - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do jamy podzarodkowej

II - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do kuli żółtkowej



Ryc.19. Wpływ różnych koncentracji treosulfanu na przeżywalność zarodków biorców oraz obecność egzogennych PGCs wyznakowanych PKH26.

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

Zachowanie się egzogennych PGCs pod kątem emisji fluorescencji w gonadach zarodków zielononózek kuropatwianych przeprowadzono w szóstym dniu życia bioców. Spośród 208 osobników poddanych sterylizacji, a potem iniekcji wyznakowanymi PKH26 PGCs, 67 (32,21%) posiadało w gonadach widoczne pierwotne komórki płciowe. Zdjęcia gonad pod mikroskopem z lampą fluorescencyjną (Tab. 25) przedstawiono w rozdziale 6.

W tabeli 16. zestawiono wpływ miejsca iniekcji i zastosowanego stężenia treosulfanu na procent zarodków z widocznymi w gonadach egzogennymi PGCs^{PKH26[+]}. Spośród grup traktowanych treosulfanem największy procent zarodków uzyskano w grupie I TREO 0,25 (40,00%), natomiast najmniejszy w grupie II, gdzie podano cytostatyk o wyższej koncentracji (22,22%). I i II grupa kontrolna uzyskały odpowiednio 46,88% i 33,33%. Nie odnotowano jednak interakcji oraz statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupami ($P > 0,05$).

Tab. 16. Detekcja fluorescencji w gonadach sterylizowanych zarodków bioców poddanych iniekcji PGCs^{PKH26[+]} - procent obliczony w stosunku do wyjściowej liczby zarodków.

grupa	n	posiada PGCs PKH26[+] %
I		%
TREO 0,5	33	27,27
TREO 0,25	35	40,00
kontrola	32	46,88
II		%
TREO 0,5	36	22,22
TREO 0,25	36	25,00
kontrola	36	33,33

I - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do jamy podzarodkowej

II - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do kuli żółtkowej

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

Analizując wpływ koncentracji treosulfanu, można zauważyć różnice pomiędzy grupą kontrolną, gdzie uzyskano najwyższą liczbę zarodków posiadających egzogenne PGCs^{PKH26[+]} - 27 zarodków, a grupą sterylizowaną treosulfanem o niższym rozcieńczeniu, gdzie liczba zarodków posiadających w swoich gonadach wyznakowane PGCs była najniższa i wynosiła 17 przypadków. Nie odnotowano jednak statystycznie istotnych zależności ($P > 0,05$). Wyniki procentowe przedstawiono w tabeli 17.

Tab. 17. Detekcja fluorescencji w gonadach sterylizowanych zarodków biorców poddanych iniekcji PGCs^{PKH26[+]}.

grupa	n	posiada PGCs ^{PKH26[+]} [%]
TREO 0,5	69	24,82
TREO 0,25	71	32,45
kontrola	68	39,44

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

Biorąc pod uwagę miejsce iniekcji emulsji cytostatyka (Tab. 18), stwierdza się, iż więcej zarodków z widocznymi PGCs^{PKH26[+]} uzyskano w przypadku wprowadzenia treosulfanu pod tarczkę zarodkową - 38 osobników. Grupa iniekowana do kuli żółtkowej posiadała 29 takich przypadków, jednak powyższe różnice okazały się być nieistotne statystycznie ($P > 0,05$). Zdjęcia gonad zarodków u których zaobserwowano PGCs^{PKH26[+]} przedstawiono w rozdziale 6. w tabeli 25.

Tab. 18. Detekcja fluorescencji w gonadach sterylizowanych zarodków biorców poddanych iniekcji PGCs^{PKH26[+]}.

grupa	n	posiada PGCs ^{PKH26[+]} szt.	[%]
I	100	38	38,00
II	108	29	26,85

I - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do jamy podzarodkowej

II - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do kuli żółtkowej

3.3.2.1. Zamieranie zarodków i patologie rozwojowe

Śmiertelność zarodków poddanych wpływowi cytostatyka określono w 3,5 dobie rozwoju embrionalnego. Zarodki, które wykazywały normalne oznaki życia (bicie serca, prawidłowe wypełnienie naczyń krwionośnych, brak krwawych pierścieni itd.) przeznaczono do iniekcji PGCs^{PKH26[+]}. W rozdziale 6 przedstawiono zdjęcia zmarłych zarodków (Tab. 26).

Spośród stu zarodków traktowanych pod tarczkę zarodkową (Tab. 19), 23 uznano za martwe. Najniższym procentem śmiertelności (15,65%) charakteryzowała się grupa kontrolna, a najwyższym grupa, której podano treosulfan o koncentracji 0,5mg/ml (27,27%). Zaobserwowano, że wraz ze zwiększającym się stężeniem cytostatyka zwiększa się śmiertelność

spowodowana wylewem w drugiej dobie. Różnice te okazały się być statystycznie istotne ($P < 0,05$).

Tab. 19. Przyczyny śmierci zarodków do 3,5 doby rozwoju, którym podano emulsję treosulfanu pod tarczkę zarodkową (test Chi-kwadrat).

	martwe/wysterylizowane śmiertelność	przyczyna zamarcia	
TREO 0,5	9/33 27,27%	6 wylewów w 2. dobie 3 brak oznak startu rozwoju	*
TREO 0,25	9/35 25,72%	5 wylewów w 2. dobie 4 brak oznak startu rozwoju	*
kontrola	5/32 15,65%	4 wylewy w 2. dobie 1 brak oznak startu rozwoju	*

* - różnice istotne statystycznie dla $P < 0,05$

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

W grupie iniekowanej do kuli żółtkowej (Tab. 20) sterylizacji poddano 108 zarodków, z czego do 3,5 doby nie przetrwało 16 zarodków - najwięcej w grupach doświadczalnych, najmniej w grupie kontrolnej. Dodatkowo trzy jaja okazały się być niezapłodnione. Odnotowano statystycznie istotną zależność pomiędzy zastosowanym stężeniem a dobą zamarcia zarodków ($P < 0,05$). Najwięcej wylewów w drugiej dobie zaobserwowano w grupie, w której podano większe stężenie treosulfanu. Z kolei, najwięcej zamarcie w trzeciej dobie zanotowano w grupie gdzie do sterylizacji użyto mniejszej koncentracji tego cytostatyka.

Tab. 20. Przyczyny śmierci zarodków do 3,5 doby rozwoju, którym podano emulsję treosulfanu do kuli żółtkowej (test Chi-kwadrat).

grupa	martwe/wysterylizowane śmiertelność	przyczyna zamarcia	
TREO 0,5	8/36 22,22%	(1 niezapłodnione) 5 wylewów w 2. dobie 2 zamarcia ok. 3 doby	*
TREO 0,25	8/36 22,22%	(2 niezapłodnione) 2 wylewy w 2. dobie 4 zamarcia ok. 3 doby	*
kontrola	3/36 8,33%	2 wylewy w 2. dobie 1 zamarcia ok. 3 doby	*

* - różnice istotne statystycznie dla $P < 0,05$

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

Wysterylizowane 3,5-dniowe zarodki biorców o prawidłowym ułożeniu (Fot.15. w rozdziale 6.) zakwalifikowano do iniekcji PGCs^{PKH26[+]}, pozostałe (Fot. 14. w rozdziale 6.) zostały odrzucone ze względu na uniemożliwiony do nich dostęp. Poddane iniekcji zarodki inkubowano przez kolejne 3 dni po czym określono (w 6. dobie rozwoju zarodkowego - w dniu detekcji fluorescencji w gonadach) śmiertelność oraz dobę zamarcia. Aby sprawdzić czy istnieje zależność pomiędzy śmiercią zarodka, a zastosowaną metodą podania oraz koncentracją treosulfanu wykonano test Chi-kwadrat. Zdjęcia zamarych zarodków przedstawiono w tabeli 26. w rozdziale 6.

Analizując grupę I - sterylizowaną pod tarczkę zarodkową (Tab. 21), 74 zarodki spośród 77 żywych zarodków było centralnie ułożonych i nadawało się do iniekcji PGCs^{PKH26[+]}. Tylko w grupie gdzie podano treosulfan o koncentracji 0,5mg/ml wszystkie zarodki były prawidłowo ułożone. Uzyskane różnice nie były jednak statystycznie istotne ($P > 0,05$). Największą śmiertelność po iniekcji komórek odnotowano w grupie TREO 0,5 i wynosiła ona 7 zarodków, spośród których 4 zamarało w 3-4 dobie. W każdej z grup doświadczalnych i kontrolnej wystąpiły po 2 zamarcia w 5-6 dobie. Jednak wykonany test Chi-kwadrat nie potwierdził statystycznie istotnych zależności ($P > 0,05$).

Tab. 21. Wpływ sterylizacji treosulfanem pod tarczkę zarodkową i iniekcji PGCs^{PKH26[+]} na śmiertelność zarodków biorców (test Chi-kwadrat).

grupa	prawidłowo ułożone/żywe do iniekcji zakwalifikowano*	martwe/ iniektowane śmiertelność %	przyczyna zamarcia
TREO 0,5	24/24 100,00%	7/24 29,17%	4 zamarcia w 3-4 dobie 1 brak oznak dalszego rozwoju 2 zamarcia w 5-6 dobie
TREO 0,25	24/26 92,31%	3/24 12,50%	1 zamarcie w 3-4 dobie 2 zamarcia w 5-6 dobie
kontrola	26/27 96,30%	3/26 11,54%	1 zamarcie w 3-4 dobie 2 zamarcia w 5-6 dobie

* zarodki odrzucone - przesunięte, brak dojścia

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

W przypadku grupy II - sterylizowanej do kuli żółtkowej (Tab. 22), spośród 89 zarodków, które przeżyły sterylizację 4 były nieprawidłowo ułożone i nie zostały zakwalifikowane do dalszego etapu badań. Podobnie jak w przypadku grupy I, tylko w grupie gdzie podano wyższe stężenie treosulfanu

wszystkie zarodki charakteryzowały się centralnym ułożeniem. Nie wykazano jednak statystycznie istotnych różnic w tym zakresie ($P > 0,05$). Najwyższą zamieralność embrionów po iniekcji komórek wykazano w grupie TREO 0,5 i wynosiła ona 6 zarodków, spośród których po 3 zmarło w 5-6 dobie i nie podjęło dalszego wzrostu po iniekcji PGCs^{PKH26[+]}. W grupie kontrolnej liczba martwych osobników była najniższa spośród pozostałych doświadczalnych grup i wynosiła 2 zarodki, które nie podjęły rozwoju po wstrzyknięciu im do krwiobiegu PGCs^{PKH26[+]}. Jednakże uzyskane wyniki okazały się być statystycznie nieistotne ($P > 0,05$).

Tab. 22. Wpływ sterylizacji treosulfanem do kuli żółtkowej i iniekcji PGCs^{PKH26[+]} na śmiertelność zarodków bioców (test Chi-kwadrat).

grupa	prawidłowo ułożone/żywe do iniekcji zakwalifikowano*	martwe/ iniekwane śmiertelność %	przyczyna zamarcia
TREO 0,5	28/28 100,00%	6/28 21,43%	3 brak oznak dalszego rozwoju 3 zamarcia w 5-6 dobie
TREO 0,25	27/28 96,43%	3/27 11,11%	2 zamarcia w 3-4 dobie 1 brak oznak dalszego rozwoju
kontrola	30/33 90,91%	2/30 6,67%	2 brak oznak dalszego rozwoju

* zarodki odrzucone - przesunięte, brak dojścia

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

W dniu detekcji fluorescencji (6. dzień inkubacji) w gonadach zarodków zielononózek kuropatwianych oznaczono także patologie rozwojowe. Największą liczbę zarodków z nieprawidłowościami w budowie zaobserwowano w grupie, w której treosulfan o koncentracji 0,5mg/ml podano do kuli żółtkowej (4 zarodki - 18,18%). Grupy kontrolne charakteryzowały się najmniejszym procentem zarodków z wadami morfologicznymi (2 zarodki w grupie I - 8,70% i 1 w II - 3,57%). Spośród grup w których podawano cytostatyki, najmniej zarodków z wadami w budowie odnotowano w grupie iniekwanej do jamy podzarodkowej i wynosiła ona 9,52% (2 zarodki) (Tab. 23). Jednakże test Chi-kwadrat nie potwierdził statystycznie istotnych różnic pomiędzy badanymi grupami ($P > 0,05$).

Tab. 23. Wady rozwojowe 6-dniowych zarodków biorców po sterylizacji i iniekcji PGCs^{PKH26[+]} (test Chi-kwadrat).

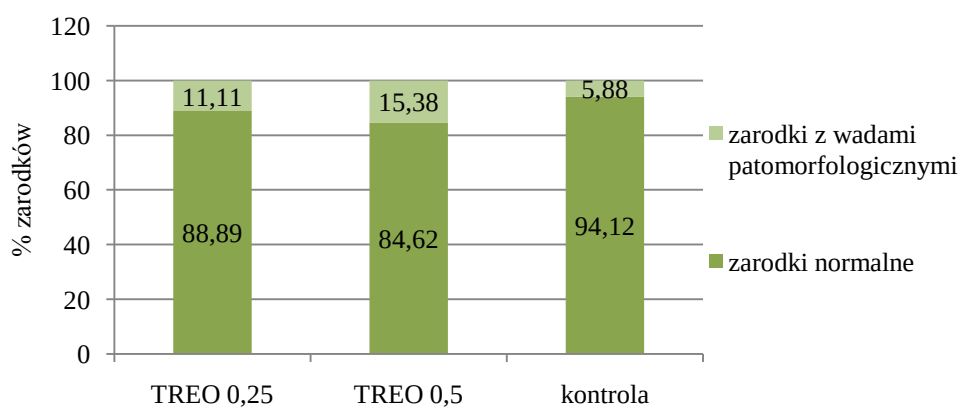
grupa	zarodki normalne	zarodki z wadami patomorfologicznymi
I TREO 0,5	88,24%	11,76%
I TREO 0,25	90,48%	9,52%
I kontrola	91,30%	8,70%
II TREO 0,5	81,82%	18,18%
II TREO 0,25	87,50%	12,50%
II kontrola	96,43%	3,57%

I - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do jamy podzarodkowej

II - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do kuli żółtkowej

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

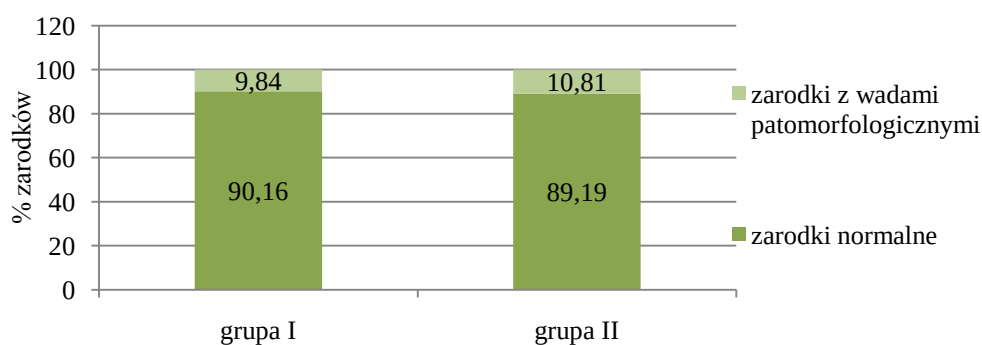
Procent embrionów z nieprawidłowościami rozwojowymi pogrupowano pod kątem zastosowanej koncentracji treosulfanu, wyniki przedstawiono na Ryc. 20. Najwięcej zarodków z wadami patomorfologicznymi odnotowano w grupie TREO 0,5 (15,38%), a najmniej w kontroli (5,88%). Grupa TREO 0,25 charakteryzowała się pośrednią wartością (11,11%). W tym przypadku test Chi-kwadrat również nie potwierdził istotnych statystycznie zależności ($P > 0,05$).



Ryc.20. Wady rozwojowe 6-dniowych zarodków biorców po sterylizacji i iniekcji PGCs^{PKH26[+]} (test Chi-kwadrat).

kontrola - zarodki, którym podano emulsję Aqua pro injectione w oleju sezamowym

Udział wad patomorfologicznych u zarodków pogrupowano również pod kątem miejsca wprowadzenia cytostatyka. Wyniki były zbliżone, jednakże nieznacznie więcej embrionów z nieprawidłowościami w budowie odnotowano w grupie, gdzie treosulfan był podany do kuli żółtkowej i wynosiły one 10,81% (Ryc. 21). Uzyskane różnice okazały się być nieistotne statystycznie po przeprowadzonej analizie statystycznej wykorzystującej test Chi-kwadrat ($P > 0,05$).



Ryc.21. Wady rozwojowe 6-dniowych zarodków biorców po sterylizacji i iniekcji PGCs^{PKH26[+]} (test Chi-kwadrat).

I - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do jamy podzarodkowej

II - zarodki, którym emulsję roztworu treosulfanu podano do kuli żółtkowej

Wszystkie zarodki z defektami patomorfologicznymi zostały pogrupowane, a następnie sfotografowane. Ich zdjęcia zebrano i przedstawiono w postaci tabeli 27. w rozdziale 6.

4. DYSKUSJA

Na świecie rozwijane są nowe technologie generacji transgenicznych ptaków poprzez zastosowanie chimer płciowych, których właściwe krzyżowanie skutkuje produkcją ptaków bioreaktorów (Bednarczyk i wsp., 2003; Sang, 2006; van de Lavoie i wsp., 2006;). W podejściu tym genetycznie zmodyfikowane pierwotne komórki płciowe będące nośnikami obcego DNA wprowadza się do zarodków kurzych celem integracji z genomem gospodarza (Speksnijder i wsp., 1999). Ponadto, PGCs i ptasie chimery płciowe mogą być wykorzystywane w biokonserwacji zagrożonych gatunków ptaków (Naito, 2003), poprzez sztuczną ich generację (wprowadzenie PGCs ptaków zagrożonych wyginięciem do wysterylizowanych zarodków kurzych i tym samym "produkcji" tych ptaków przez biorców komórek), w hodowli zwierząt i przemyśle mięsnym (Song i wsp., 2005) poprzez zmianę proporcji płci (wcześniejsze seksowanie egzogennych PGCs), a także jako narzędzie do zrozumienia złożonych mechanizmów rozwoju zarodkowego ptaków (Tagami i Kagami, 1998). Za wykorzystaniem PGCs w produkcji chimer, przemawiają ich unikalne właściwości. Związane są one z zachowaniem się PGCs oraz drogą ich migracji z regionu półksiężyca, poprzez krwiobieg, aż do zawiązków gonad, co daje możliwość powtarzalnej i efektywnej produkcji chimer płciowych.

Dużym utrudnieniem w produkcji ptasich chimer płciowych jest konieczność opanowania cyklu trudnych, pracochłonnych metod identyfikacji, izolacji i hodowli pierwotnych komórek płciowych, ich ewentualnej modyfikacji genetycznej/znakowania, skutecznym wprowadzeniu do zarodków biorców, zapewnienie optymalnych warunków do ich migracji i proliferacji oraz przekształcenie się w funkcjonalne gamety. Dopiero po spełnieniu tych wszystkich warunków można liczyć, po wylęgu, wychowie i wzajemnym krzyżowaniu chimer na dziedziczenie genotypu dawcy PGCs (wzbogaconego o ewentualny transgen) w kolejnych pokoleniach.

W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono podobnych złożonych badań, a jedynie prace skupiające się na poszczególnych aspektach-metodach, które uwzględniono w opracowaniu tej dysertacji. Do przykładów należą prace dotyczące sposobów izolacji i oczyszczania PGCs (Tajima i wsp., 1998; Li i wsp., 2005; Mozdziak i wsp., 2005; Nakajima i wsp., 2011; Naeemipour i Bassami, 2013b), zastosowania różnych układów genotypów w roli dawców i biorców PGCs (Yasuda i wsp., 1992; Kagami i wsp., 1997; Park i wsp., 2003a i 2003b; Ishiguro i wsp., 2009; Wernery i wsp., 2010; Kang i wsp., 2011; van de Lavoie i wsp., 2012; Park i Han, 2013) lub sterylizacji zarodków biorców (Mohsen i Ahmed, 2002; Song i wsp., 2005; Motono i wsp., 2009; Nakamura i wsp., 2010; Park i wsp., 2010; Lee i wsp., 2013).

Przedstawione w niniejszej pracy badania dotyczące zachowania się pierwotnych komórek płciowych dawcy i biorcy, skupiają się na czterech głównych zadaniach, których wyniki są dyskutowane, w świetle wcześniejszych badań z tego zakresu.

4.1. OPTYMALIZACJA SPOSOBU IZOLACJI PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH Z GONAD 6-DNIOWYCH ZARODKÓW KURZYCH

Pierwotne komórki płciowe wyizolowano z gonad 6-dniowych kurzych zarodków. W celu potwierdzenia charakteru PGCs, wyizolowaną zawiesinę komórek wybarwiono z użyciem kwasu paraaminosalicylowego (ang. *Peridic Acid Solution* - PAS). Barwienie PAS jest standardową, prostą i taną metodą identyfikacji kurzych PGCs (Tagami i Kagami, 1998). Jest to metoda szeroko wykorzystywana przez lata w badaniach nad kurzymi PGCs (Meyer, 1964; Yasuda i wsp., 1992; Kagami i wsp., 1997; Jung i wsp., 2005; Nakajima i wsp., 2011; Naeemipour i wsp., 2013). Należy jednak zaznaczyć, iż jest to reakcja charakterystyczna dla kurzych PGCs. Dla porównania, przepiórcze PGCs nie mogą być identyfikowane tą metodą, gdyż nie posiadają cząsteczek glikogenu (Chang i wsp., 2010). Przeprowadzona w badaniach własnych analiza morfologiczna świeżo wyizolowanych PGCs wykazała obecność dużych, okrągłych komórek o średnicy od 14-19 µm. Jak wykazano (Fot. 3 i 6), cytoplazma tych komórek zawierała liczne ziarna materiału zapasowego w postaci glikogenu, które barwią się specyficznie fuksyną w reakcji PAS. Obserwacja mikroskopowa, pod większym powiększeniem wykazała także obecność dużego jądra komórkowego o średnicy ok. 9 µm, położonego acentrycznie, które nie wykazywało powinowactwa do barwników PAS. Niektóre z PGCs posiadały pseudopodia i nieregularny kształt, co również jest charakterystyczne dla tych komórek na tym etapie rozwoju (Kuwana i Rogulska, 1999).

W piśmiennictwie często można spotkać także dodatkowe procedury oczyszczające zawiesinę PGCs (izolowanych z krwi jak i z gonad) z zanieczyszczeń drobin tła oraz innych niepożądanych komórek somatycznych jak np. elementów morfotycznych krwi. Należą do nich wirowanie w gradiencie Percollu (Oishi, 2010), wirowanie w gradiencie Ficollu (Yasuda i wsp., 1992; Park i wsp., 2003b), Nycodenz (Zhao i Kuwana, 2003), lizę erytrocytów przy pomocy buforu ACK (ammonium chloride-potassium) (Yamamoto i wsp., 2007), immunomagnetyczne oddzielanie komórek metodą MACS (magnetic-activated cell sorting) (Ono i Machida, 1999; Wei i wsp., 2001; Kim i wsp., 2004; Kang i wsp., 2009; Naeemipour i Bassami, 2013) oraz zastosowanie systemu FACS (fluorescence-activated cell sorting) wykorzystującego reakcję przeciwciał monoklonalnych przeciwko SSEA-1 (Mozdziak i wsp., 2005; Motono i wsp., 2010). Metody FACS i MACS sprawdzają się także w oczyszczaniu PGCs uzyskiwanych z gonad. Co prawda powyższe metody są skuteczne, gdyż otrzymana zawiesina PGCs charakteryzuje się większą czystością i jednorodnością, jednak jak wynika z przytoczonych badań, w czasie trwania tych procedur bezpowrotnie traci się dużą ilość PGCs, a te które przetrwają są osłabione i charakteryzują się mniejszą żywotnością. W związku z powyższym, w badaniach własnych zrezygnowano z procedur oczyszczania

komórek PGCs. Dbając jednak o ich jakość, gonady pobierano do probówki z roztworem PBS, która cały czas znajdowała się na bloku grzewczym (temperatura 37,8°C).

Do produkcji ptasich chimer PGCs mogą być izolowane z blastodermi w stadium X, czy też z krwi 2,5-3 dniowych zarodków, jednak uzyskane z tych tkanek PGCs są nieliczne. Największą liczbę PGCs do manipulacji biotechnologicznych można uzyskać izolując je z gonad 5-7 dobowych zarodków. W związku z powyższym, w niniejszej pracy PGCs izolowano z gonad 6 dniowych zarodków kurzych. Zachowanie się pierwotnych komórek płciowych pod kątem zdolności do migracji z gonad zbadano izolując je trzema różnymi metodami. Przedstawione metody izolacji PGCs z gonad 6-dniowych zarodków kurzych zostały opracowane, w oparciu o badania Nakajima i wsp., (2011). Autor ten sugeruje nową, prostą metodę pozyskiwania gonadalnych PGCs o wysokim stopniu oczyszczenia (ok. 50%) i wysokiej żywotności poprzez inkubację gonad (w temperaturze 37,8°C i 5% nasyceniu CO₂) pochodzących od 7-dniowych embrionów w roztworze PBS pozbawionym jonów wapnia i magnezu (PBS[-]). Jest to obecnie najwydajniejsza metoda izolacji PGCs z gonad zarodków kurzych, gdyż w stosunkowo krótkim czasie daje możliwość uzyskania dużej liczby, dobrze oczyszczonych i żywotnych PGCs (Nakamura i wsp., 2013).

W doświadczeniu własnym, metoda ta została rozbudowana o mechaniczne rozdrobnienie gonad(A) lub nadtrawienie ich 0,25% roztworem trypsyny-EDTA(B), a także w niezmienionej postaci stanowiła grupę kontrolną(C). W ten sposób, w prezentowanych badaniach, uzyskano bardzo liczne PGCs. Najwięcej, bo aż ponad 198 tysięcy komórek uzyskano w grupie kontrolnej, najmniej w grupie A (ponad 128 tysięcy komórek), gdzie gonady dodatkowo rozdrobniono mechanicznie. Grupa gonad trawionych trypsyną-EDTA uwolniła prawie 160 tysięcy komórek. Bardzo niska liczba uzyskanych PGCs w grupie gonad mechanicznie rozdrobnionych może być wynikiem zlepiania się komórek i przyklejania do porożcinanej tkanki gonad w formie dużych agregatów PGCs. Silne oddzielenie się PGCs od gonad w dwóch pozostałych grupach i ich migracja do PBS[-] mogą wskazywać na bardzo słabe związanie PGCs z komórkami somatycznymi gonad u 6-dniowych embrionów. Należy zaznaczyć także, iż średnia liczba PGCs w zarodku wynosiła od ok. 5,3 do ok. $8,2 \times 10^3$ PGCs, i była znacznie wyższa od danych literaturowych [np. Motono i wsp., (2010) wyizolował $1,0 \times 10^3$ PGCs na jeden zarodek, a Mozdział i wsp., (2006) ok. $0,7 \times 10^3$]. Taka rozbieżność obok sposobu izolacji może wynikać także z jakości zarodków, ich pochodzenia, rasy i typu użytkowego, jak i przede wszystkim ze stopnia rozwoju gonad. Dostępne badania są bardzo zróżnicowane i nieujednolicone w tym zakresie. Z reguły PGCs pobierane są z gonad w 27-28 stadium rozwoju wg H&H co przekłada się na 5-5,5 dobę inkubacji (Chang i wsp., 1997; Han i wsp., 2002). W badaniach prezentowanych w tej pracy czas inkubacji jaj wynosił 6 dni co przyczyniło się do pojawienia się większej liczby PGCs w gonadach, gdyż miały one więcej

czasu na proliferację. Również wspomniany blok grzewczy używany podczas długotrwałej izolacji gonad mógł przyczynić się do kontynuacji mnożenia się PGCs.

Li i wsp., (2005) wykazał, iż najwięcej PGCs można uzyskać izolując je z gonad ze stadium 28 (wg H&H). Izolacja ta musi być jednak połączona z trawieniem tkanki 0,25% roztworem trypsyny-EDTA, aby uzyskać zawiesinę pojedynczych, wolnych od agregatów PGCs oraz innych komórek somatycznych, wchodzących w skład gonad. Roztwór trypsyny-EDTA umożliwia uwolnienie PGCs uwieczonych w zwartej tkance wchodzącej w skład gonad. Czas trawienia nie może być jednak zbyt długi, gdyż nadtrawieniu mogą ulec również PGCs, ani za krótki, gdyż nie wszystkie PGCs zostaną uwolnione z tkanki. Posiłkując się wynikami Chojnacka-Puchta i wsp., (2015) oraz Sawicka i wsp., (2015) w przedstawionej pracy również przyjęto czas trawienia trypsyną-EDTA równy 60s. Uzyskana w badaniach własnych przeżywalność PGCs poddanych trawieniu trypsyną-EDTA (ok. 72%) znacznie różni się od tej prezentowanej przez Li i wsp., (2005) (ok. 90%). Różnica ta może wynikać z przeprowadzonej po izolacji godzinnej inkubacji komórek w komorze CO₂ w roztworze PBS pozbawionego jonów wapnia i magnezu. Utrzymywanie komórek przez jedną godzinę bez jakiegokolwiek dodatku medium i składników odżywczych mogło spowodować wyższą śmiertelność PGCs. Potwierdzeniem tego wydają się być zbliżone wyniki przeżywalności PGCs z grupy gonad mechanicznie rozdrobnionych (ok. 73%) i nienaruszonych-kontrolna (ok. 76%).

Zachowanie się gonadalnych PGCs oceniono także w odniesieniu do zdolności adhezyjnych PGCs względem siebie, tj. do tworzenia agregatów. Kontrolowanie procesów agregacji PGCs to jeden z kluczowych czynników do utrzymania wysokiej liczby komórek nadających się do dalszych manipulacji (Yu i wsp., 2011). PGCs po opuszczeniu gonad w warunkach hodowli *in vitro* zaczynają gwałtownie formować agregaty komórkowe (Di Carlo i De Felici, 2000). Jest to spowodowane obecnością białkowych cząsteczek adhezji komórkowej (ang. cell adhesion molecules - CAMs) na powierzchni PGCs, które działają jako swoisty czynnik sklejający znajdujące się w bliskiej odległości komórki (Karagenc i Petite, 2000). W dostępnej literaturze nie znajdujemy natomiast wzmianki o zależności pomiędzy sposobem izolacji PGCs z gonad, a tworzeniem się agregatów komórkowych. Metoda nadtrawiania trypsyną-EDTA jako jedyna nie dała efektu pojawienia się takich konglomeratów we wszystkich trzech powtórzeniach eksperymentu, co może wskazywać na zdolności inaktywacyjne trypsyny-EDTA względem CAMs. Przypuszcza się także, iż w pozostałych grupach (A i C) duża ilość komórek somatycznych wchodzących w skład gonad, które nie poddane trawieniu, zadziałały jako substancje spajające PGCs.

4.2. BADANIE WPŁYWU DAWCY I BIORCY KOMÓREK, NA DETEKCJĘ EGZOGENNYCH PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH W GONADACH ZARODKÓW BIORCÓW

Migracja PGCs przenoszonych w obrębie kurcząt tych samych ras/typów jak na razie nie jest możliwa do zmierzenia, gdyż nie odkryto jeszcze odpowiedniego i łatwego w detekcji markera genetycznego pozwalającego na odróżnienie dawców i biorców komórek (Motono i wsp., 2010). Jedynie wcześniejsza modyfikacja komórek z wykorzystaniem np. genu markerowego – green fluorescent protein (GFP) pozwala na identyfikację tego genu w zarodkach biorcach (Chojnacka-Puchta i wsp., 2015). Jest to jednak procedura trudna, czaso- i kosztochłonna. W związku z tym, w niniejszej pracy zdecydowano się na wyznakowanie PGCs fluorochromem PKH26.

Fluorochrom PKH26 jest powszechnie używanym znacznikiem gonadalnych i krwioobiegowych PGCs w badaniach nad tworzeniem chimer ptasich (Jeong i Han, 2002; Park i wsp., 2003a; Minematsu i wsp., 2004; Yamamoto i wsp., 2007; Kang i wsp., 2008; Kang i wsp., 2009; Jung i wsp., 2010; Nakamura i wsp., 2010; Kang i wsp., 2011; Nakajima i wsp., 2011; Miyahara i wsp., 2014). Wiąże się on nierozdzielnie z błoną komórkową znakowanych PGCs, co umożliwia śledzenie drogi migracji egzogennej komórek i miejsca ich osadzenia się w gonadach biorców. Fototoksyczność PKH26 została zbadana na ludzkiej linii komórek hematopoetycznych (Oh i wsp., 1999). Wykazano wówczas, że sam fluorochrom nie wpływa negatywnie na żywotność i rozwój komórek. Dopiero wystawienie znakowanych komórek na światło fluorescencyjne mikroskopu drastycznie obniża te dwa parametry.

Wyzolowane w badaniach własnych komórki poddano lub nie znakowaniu fluorochromem PKH26 i umieszczono w medium wzrostowym OPTI-MEM® I w celu przeprowadzenia oceny zachowania się PGCs w krótkoterminowej hodowli PGCs *in vitro*. Wcześniej dowiedziono, iż PGCs wyizolowane z 5-dniowych zarodków kurzych mają zdolność do mnożenia się w warunkach *in vitro* nawet podczas pierwszych dwóch dni hodowli pierwotnej (Allioli i wsp., 1994), osiągając nawet 3,8-krotny przyrost w czwartym dniu hodowli (Chang i wsp., 1995). Ponadto wykazano, iż krótkie utrzymywanie *in vitro* PGCs może zwiększyć wydajność transmisji germinalnej (Park i wsp., 2003b). W badaniach własnych, po kilku godzinach od umieszczenia PGCs w dołku hodowlanym, komórki somatyczne zaczęły przywierać do powierzchni dna naczynia i formować się w fibroblasto-podobną warstwę na której utrzymywały się nieadherentne PGCs. Po pierwszym dniu hodowli, PGCs zaczynały tworzyć skupiska składające się z kilku, kilkunastu komórek i przyklejać się do warstwy fibroblastu. W trzecim dniu hodowli w medium OPTI-MEM® I komórki zaczęły gwałtownie się kurczyć a ich cytoplazma ciemnieć. Śmierć komórek PGCs^{PKH26[+]} jak i PGCs^{PKH26[-]} nastąpiła najprawdopodobniej w wyniku braku

substancji odżywczych, braku czynników wzrostowych oraz innych suplementów potrzebnych do prawidłowego rozwoju.

Innym wyjaśnieniem mogą być niemożliwe do uniknięcia fizyczne i fizykochemiczne urazy spowodowane podczas izolacji PGCs oraz w trakcie kolejnych procedur, które w konsekwencji przyczyniły się do śmierci tych komórek. Spadek całkowitej liczebności PGCs w krótkoterminowej hodowli może być tłumaczony, jak wspomniano, brakiem czynników wzrostowych w medium, co prowadzi do śmierci komórek. Do podobnych wniosków doszedł Li i wsp., (2005), który w swojej krótkoterminowej hodowli gonadalnych PGCs używał medium TCM-199 z 10% dodatkiem cielęcego serum zaobserwował zmniejszoną z 80,5% do 7,9% żywotność świeżo wyizolowanych PGCs po 72h hodowli *in vitro*.

W badaniach własnych, pomiędzy pierwszym a trzecim dniem utrzymywania PGCs *in vitro* uzyskano co prawda 17,16% wzrost przeżywalności PGCs znakowanych PKH26 oraz 21,26% wzrost przeżywalności PGCs nie wyznakowanych fluorochromem, jednak całkowita liczba PGCs znacznie spadła w ciągu tych trzech dni. Spadek ten jest większy w przypadku komórek wyznakowanych fluorochromem gdzie odnotowano o 46,57% mniej komórek w dniu trzecim, w porównaniu do dnia pierwszego. Nieco mniejszą śmiertelność na poziomie 39,40% uzyskano w grupie PGCs nieznakowanych. Uzyskana niższa przeżywalność PGCs^{PKH26[+]} w stosunku do PGCs^{PKH26[-]} może być więc zgodna ze wspomnianym wcześniej twierdzeniem odnośnie fototoksycznego wpływu fluorochromu. Wyznakowane komórki zostały poddane naświetlaniu UV pod mikroskopem podczas ich liczenia oraz obserwacji hodowli na płytce. Wówczas mogło dojść do fototoksycznego efektu PKH26 i wzrostu zamieralności PGCs.

Ciekawe konkluzje wysunął Kim i wsp., (2005). Zbadał on zachowanie się przepiórczych PGCs - świeżo izolowanych z 5-dniowych zarodków oraz poddanych 3 dniowej hodowli *in vitro* w medium zoptymalizowanym wcześniej dla kurzych PGCs. Korzystniejsze pod względem wylęgowości kurcząt, procentu kurcząt chimerycznych oraz stopnia transmisji germinacji okazały się być PGCs niehodowane niż te poddane 3-dniowej hodowli. W związku z powyższym oraz ze zmniejszoną przeżywalnością PGCs w trzecim dniu hodowli, w niniejszej pracy zrezygnowano z badania wpływu krótkoterminowej hodowli *in vitro* na możliwości migracyjne już bardzo osłabionych PGCs poprzez ich ponowną iniekcję do krwiobiegu biorców.

W dostępnej literaturze możemy ponadto znaleźć zachowanie się PGCs w długoterminowych hodowlach *in vitro* (Kuwana i wsp., 1996; Macdonald i wsp., 2010; Naito i wsp., 2010; Miyahara i wsp., 2014), jednak wykorzystane tam pożywki są znacznie bardziej złożone od tej zastosowanej w badaniach własnych, tak aby móc podtrzymać niezachwiany wzrost i proliferację PGCs bez wpływu na utratę aktywności migracyjnej i biologicznej. Obserwacje zdolności migracyjnych PGCs pochodzących z długoterminowych hodowli *in vitro* są sprzeczne. Han i wsp., (2002) uważa, iż PGCs zachowują swoje

zdolności migracyjne, aktywność biologiczną i potencjał transmisji germinacji nawet po dwumiesięcznej hodowli *in vitro*. Ponadto nie tracą potencjału do ekspresji markerów pluripotencji i integracji z gonadami biorców (Shiue i wsp., 2009). Również Park i wsp., (2003b) twierdzi, iż odpowiednie przygotowanie *in vitro* komórek PGCs przed wprowadzeniem ich do zarodków biorców wpłynie na zwiększenie transmisji germinacji u chimer. Z kolei Miyahara i wsp., (2014), uważa, iż długoterminowa hodowla PGCs obniża ich zdolności migracyjne, co objawia się mniejszą liczbą egzogennych PGCs w gonadach w porównaniu do świeżo izolowanych PGCs wprowadzonych do zarodków biorców. Wiadomo natomiast, iż PGCs zachowują zwoje zdolności do migracji w krwiobiegu zarodków biorców, do kolonizacji gonad oraz do tworzenia funkcjonalnych gamet nawet po poddaniu ich mrożeniu w ciekłym azocie (Tajima i wsp., 1998) czy oczyszczaniu w gradiencie Ficollu (Jeong i wsp., 2002) czy Percollu (Chojnacka-Puchta i wsp., 2015).

W kolejnym etapie niniejszej pracy zbadano zachowanie się kurzych pierwotnych komórek płciowych pod kątem zdolności migracyjnych PGCs dawcy w organizmie biorcy. W oparciu o % zarodków u których wykryto widoczne, wyznakowane fluorochromem PGCs wybrano wydajniejszą kombinację genotypów: Ross 308 → zielononóżka kuropatwana. Teoretycznie, na taki wynik mogło wpłynąć wiele czynników. W badaniach własnych, czynniki, które mogły mieć znaczenie, to uwarunkowany genetycznie potencjał proliferacyjny i zdolności migracyjne PGCs dawców oraz zdolności biorców do przyjmowania egzogennych PGCs, które mogą różnić się pomiędzy rasami użytymi w badaniach własnych. Innym wyjaśnieniem może być związana z rasami różna aktywność enzymów oraz innych substancji biorących udział w migracji PGCs, a także dopasowanie stadiów rozwojowych dawców i biorców PGCs.

Na uzyskane w badaniach wyniki dotyczące układu dawców i biorców, rzutować mógł zależny od ras potencjał proliferacyjny osiadłych w gonadach biorców egzogennych PGCs i współzawodnictwo o miejsce w gonadach z endogennymi PGCs. W literaturze nie znajdujemy informacji jak względem powyższego mogły zachowywać się PGCs zielononóżki kuropatwanej i Ross 308. Zespół Nakamura i wsp., (2011) wykorzystał PGCs pochodzące od trzech różnych ras kur: White Leghorn, Barred Plymouth Rock i Fayoumi. Wprowadzając taką samą liczbę komórek do krwiobiegu zarodków biorców udowodnił, iż liczba włączonych egzogennych PGCs w gonadach 6-dniowych zarodków biorców różni się statystycznie pomiędzy użytymi rasami kur. Różnice te wpłynęły na późniejszy stosunek pomiędzy komórkami płciowymi pochodzenia egzo- i endogennego. Wiadomo zatem, iż potencjał do namnażania się PGCs *in vivo* w gonadach może różnić się pomiędzy rasami kur. Zdolność do proliferacji PGCs może również różnić się w hodowli *in vitro* (Miyahara i wsp., 2014) - PGCs izolowane od zarodków Barred Plymouth Rock uzyskały większy stopień proliferacji niż izolowane od Leghorna. Jednak, w doświadczeniu własnym nie odnotowano statystycznie istotnej zależności

między zachowaniem się PGCs izolowanymi od zarodków Ross 308 lub zielononózki odnośnie zdolności do proliferacji *in vitro*, co nie wyklucza takich zależności w warunkach *in vivo*, bądź w precyzyjnie dopasowanym medium hodowlanym.

Rozmiar populacji PGCs może się różnić w zależności od gatunku oraz typu towarowego dawcy, a nawet pomiędzy różnymi stadami ptaków. W badaniach własnych nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic w liczbie komórek uzyskanych od zarodków zielononózki kuropatwianej lub zarodków Ross 308 (odpowiednio $3,788 \times 10^6$ vs $3,33 \times 10^6$). Również w dostępnej literaturze nie znaleziono publikacji, w której porównywano liczbę PGCs pomiędzy rasami ptaków, jednak istnieją pojedyncze wzmianki o doborze ras dawców i biorców tych komórek. Naito i wsp., (1994) udowodnił że efektywność transmisji germinalnej może być zwiększona nawet 3,5-krotnie jeżeli rasy dawców i biorców zostaną odpowiednio dobrane. W swoich badaniach lepsze rezultaty uzyskał, przyjmując za dawcę białego Leghorna, a za biorcę kury rasy Barred Plymouth Rock niż w odwrotnej kombinacji. Również inni autorzy (Ono i wsp., 1998a i b; Park i wsp., 2003b) wskazują, iż odpowiednia kombinacja ras użytych do roli dawców i biorców może wpłynąć na poprawę bądź pogorszenie stopnia chimeryzmu i transmisji germinalnej. Co więcej, wydajność ta może być również zmieniana przez kombinacje linii towarowych w obrębie rasy (Nakamura i wsp., 2010). Powyższe badania oraz wyniki własne dowodzą, iż problem niskiej liczby egzogennych PGCs zintegrowanych z zarodkami biorców może być rozwiązany przez odpowiedni dobór genotypów dawców i biorców komórek.

Podobne wnioski wysunięto w niniejszej pracy. Ponad 16,5 razy efektywniejsza (54,5% vs 3,3%) okazała się kombinacja gdzie dawcą PGCs był Ross 308, a biorcą zielononózka kuropatwiana, w porównaniu do odwrotnego układu. Również homogenne kombinacje wykazały znaczące różnice. Zielononózki charakteryzowały się w tym względzie wyższą liczbą zarodków u których detekowano egzogenne PGCs w gonadach biorców (19%), podczas gdy w grupie Ross 308 uzyskano tylko 8,3% chimerycznych zarodków.

W przypadku kur mamy do czynienia z asymetryczną migracją PGCs - więcej komórek migruje w kierunku lewej aniżeli prawej gonady (Ono i wsp., 1996; Nakamura i wsp., 2007), co w konsekwencji może dać wyższą liczbę proliferujących PGCs w lewej gonadzie (Nakajima i wsp., 2011). W badaniach własnych nie mierzono jednak liczby egzogennych PGCs w poszczególnych gonadach, dlatego wymagane są dalsze optymalizacje w tym kierunku.

Zmniejszenie zdolności migracyjnych komórek zarodkowych w różnych układach genotypów może także wynikać ze zróżnicowania ich składu chemicznego pomiędzy rasami i typami użytkowymi kur. W niniejszej pracy nie prowadzono jednak badań porównujących skład chemiczny PGCs izolowanych od Ross 308 czy zielononózki. Wiadomo jednak, iż w migrację PGCs w kierunku zawiązków gonad zaangażowane są takie substancje jak integriny, CXCR4 (Stebler i wsp., 2004; Kunwar i wsp., 2006; Motono i wsp.,

2008), cząsteczki zewnątrzkomórkowego matrixu, takie jak lamininy, fibronektyny, siarczan chondroityny, kolagen typu IV (Urven i wsp., 1989) i tenascyna-C (Anstrom i Tucker, 1996). Wysuwa się przypuszczenie, iż wielkość ekspresji tych substancji różni się pomiędzy rasami Ross 308 i zielononózką kuropatwianą.

Innym wyjaśnieniem uzyskanych w niniejszej pracy wyników może być asynchronia stopnia rozwoju dawców i biorców PGCs pochodzących od różnych ras. Mimo, iż w badaniach własnych wykorzystano PGCs pochodzące od 6 dobowych zarodków i wprowadzono je do 3,5 dobowych embrionów, to stopień rozwoju zarodków Ross 308 znacznie się różnił od zielononózki kuropatwianej co mogło wpłynąć na zachowanie się PGCs. Tą ostatnią, jako starą, rodzimą rasę - mało zmienioną genetycznie cechuje wolniejszy rozwój zarodkowy niż kurczęta Ross 308, które przez lata poddawano bardzo dużej presji selekcyjnej (Buzala i wsp. 2015). Innymi słowy w badaniach własnych zaobserwowano, iż 3,5-dniowe oraz 6-dniowe zarodki Ross 308 są większe i bardziej rozwinięte niż 3,5-dniowe oraz 6-dniowe zarodki zielononózki. Ta różnica anatomiczno-fizjologiczna mogła mieć wpływ na uzyskane w wyniki. Precyzując, w stadium 13-15 (H&H) PGCs opuszczają serce rosnącego zarodka i kontynuują swoją wędrówkę w kierunku załączków gonad. W czasie tych stadiów, brzuszna aorta rozwija się najpierw w kierunku dogłowowym, a dopiero potem doogonowym (Bernardo i wsp., 2012). W związku z tym, kiedy mikroiniekcja egzogennych PGCs zostanie wykonana zanim nastąpi wspomniany rozwój naczyń krwionośnych, bądź kiedy niemożliwe będzie wklucie się w brzuszne odgałęzienie aorty, komórki mogą zostać uwięzione w sieci naczyń włosowatych głowy - tak mogło być w badaniach własnych. Potwierdzeniem tego wydają się być badania Nakamura i wsp., (1991), gdzie PGCs odkładają się w pobliżu głowy u embrionów pozbawionych brzusznej części. Wykazano, iż od 8,7% do 20% całkowitej populacji PGCs odkłada się w okolicach głowy embriona jako tzw. zewnątrzgonadalne PGCs i jest naturalnym zjawiskiem (Nakamura i wsp., 1988; Yasuda i wsp., 1992; Kuwana, 1993; Ishiguro i wsp., 2009). Wydaje się zatem, iż na uzyskaną w pracy wydajność produkcji chimer płciowych ma wpływ stopień zsynchronizowania zarodków dawców i biorców, pochodzących od różnych ras, a także proporcja i rozlokowanie PGCs dawcy migrujących w kierunku gonad zarodka biorcy. Ciekawe jest to, iż PGCs gonadalne mają niższy potencjał do zagnieżdżenia się w gonadach po wprowadzeniu do zarodka biorcy, niż PGCs izolowanych z krwi (Naito i wsp., 1994; Han i wsp., 2002; Park i wsp., 2003b).

W pracy własnej zrezygnowano z izolacji PGCs z krwi, gdyż jest to metoda dużo trudniejsza, bardziej pracochłonna i dająca niewielką liczbę PGCs. Jednak, w przypadku kiedy PGCs izolowane są z gonad 5-7 dniowych zarodków i wprowadzane do krwiobiegu 2,5-3,5-dniowych zarodków wskaźnik transmisji germinalnej gamet pochodzących od dawcy komórek sięga do mniej niż 28%. Ten sam wskaźnik osiąga dużo większe wartości (prawie 98%) kiedy dawcy PGCs są na takim samym etapie rozwoju co biorcy (Naito i wsp., 2007).

Minematsu i wsp., (2004) oceniał zdolności migracyjne PGCs izolowanych z różnych stadiów rozwojowych zarodków kurzych używając dwóch indykatorów - procentu zarodków biorców z obecnymi w gonadach PGCs wyznakowanymi fluorochromem PKH26 oraz całkowitej liczby wyznakowanych PGCs w tych gonadach. Pierwszy ze wspomnianych wskaźników wynosił 100% kiedy dawcami PGCs były 6,5 i 10,5-dniowe zarodki, natomiast drugi wykazywał niższe wartości gdy komórki izolowane były od 14,5-dniowych i starszych zarodków. Jednak mimo zmniejszającej się (wraz z kolejnymi stadiami rozwojowymi) zdolności egzogennych PGCs do zagnieżdżenia w gonadach biorców, nie ulega ona całkowitemu zahamowaniu nawet w przypadku gdy PGCs pochodzą od 20-dniowego dawcy (Naito i wsp., 2007). Zaś sam potencjał do różnicowania się w gamety nie ulega upośledzeniu nawet jeżeli PGCs zostaną wyizolowane z różnych stadiów rozwojowych zarodków kurzych (Jung i wsp., 2010). Własne badania potwierdzają powyższe. W układzie R→ZK (najkorzystniejszym) komórki były pozyskiwane z 6-dniowych embrionów Ross 308 i wprowadzane do 3,5-dniowych embrionów zielononózek. Przypuszcza się wówczas, iż biorcy, byli wtedy w najkorzystniejszym (spośród testowanych układów) stadium rozwojowym do przyjmowania egzogennych PGCs. W odwrotnym układzie (ZK → R) biorcy, zważywszy na to, że cechuje je szybszy rozwój zarodkowy, byli już "za starzy" na tak optymalne przyjęcie komórek.

Mało prawdopodobnym jest, iż czynniki takie jak układ płci dawców i biorców, liczba iniekowanych PGCs, ingerencje do struktury PGCs i ich przygotowanie do iniekcji wpłynęły na % uzyskanych zarodków chimerycznych, gdyż elementy te były stałe - nie różnicowały grup.

Według danych literaturowych układ płci dawców i biorców jest jednym z czynników, który może wpływać na skuteczność wbudowywania się egzogennych PGCs do gonad biorców. Efektywność produkcji ptasich chimer płciowych oraz stopień transmisji zarodkowej są wyższe, kiedy dawca i biorca komórek są tej samej płci (Tagami i wsp., 1997; Naito i wsp., 1999; Macdonald i wsp., 2010; Yamaguchi i wsp., 2000; Kang i wsp., 2009; Park i Han, 2013). W badaniach własnych komórki które zostały użyte do stworzenia chimerycznych zarodków pochodziły od obu płci, tzn. były miksem samców i samic. Układów dawców i biorców nie rozgraniczano więc pod kątem płci. W związku z tym, jeżeli płciowo-specyficzne różnice kurzych PGCs wpłynęły na uzyskane wyniki, to w podobnym stopniu we wszystkich układach.

Kolejnym czynnikiem, który był stały w doświadczeniu własnym, i nie miał wpływu na uzyskane wyniki jest liczba iniekowanych PGCs, która uważana jest za jeden z najważniejszych elementów wpływających na procent chimeryzmu. Iniekcja wysokiej liczby egzogennych PGCs do embrionów biorców zwiększa liczbę PGCs wykazujących migrację w kierunku zawiązków gonad (Kim i wsp., 2010). Z drugiej strony istnieje przypuszczenie, że duża liczba iniekowanych PGCs może przyczynić się do obniżenia ich zdolności migracyjnych (Motono i wsp., 2010), a w konsekwencji do niewielkiego

procentu chimeryzmu. Liczba wprowadzanych do zarodków biorców PGCs jest bardzo zróżnicowana pomiędzy dostępnymi danymi literaturowymi - od 50 (Nakajima i wsp., 2011), przez 900 (Kim i wsp., 2010) do aż 3600-4000 PGCs/zarodek (Kang i wsp., 2008). Wykorzystana w badaniach własnych liczba iniekowanych PGCs na jeden zarodek była taka sama dla wszystkich czterech układów dawców i biorców i wynosiła ok. 1000 komórek, co również przyniosło efekt w postaci chimerycznych zarodków. Wyniki te skłaniają do założenia, że duża liczba iniekowanych PGCs nie ma wpływu na obniżenie zdolności migracyjnych PGCs.

Postępowanie z PGCs we wszystkich układach genotypów było takie samo, tak więc ingerencje do struktury PGCs i postępowanie *in vitro* z nimi nie wpłynęły na uzyskane w badaniach własnych wyniki. Manipulacje takie jak np. wykorzystane w niniejszej pracy wyznakowanie fluorochromem, (które jak dowiedziono może osłabiać PGCs), czy genetyczne modyfikacje (Kim i wsp., 2010), mogą upośledzać zdolności migracyjne PGCs co spowoduje wykluczenie ich z naturalnej wędrówki w krwiobiegu ku gonadom. Tylko wykazujące wysoki stopień proliferacji manipulowane wcześniej PGCs, mogą migrować do gonad. Jednak wiele z wyznakowanych fluorochromem komórek PGCs osiadło w gonadach, co sugeruje że komórki pochodzące od dawcy zachowały wysoką aktywność biologiczną.

W pracy własnej zbadano także jak ingerencja do krwiobiegu zarodków biorców w postaci iniekcji PGCs oraz obecność otworu iniekcyjnego w skorupie jaja wpływają na przeżywalność zarodków biorców. Aby uchronić zarodek przed śmiercią spowodowaną zakażeniem w badaniach własnych wydrążone w skorupach otwory zaklejano jałowym parafilmem o wymiarach ok. 2x2cm. Uzyskano wówczas znaczącą różnicę (7,16%) w przeżywalności 6 dobowych zarodków poddanych lub nie iniekcji PGCs wyznakowanych fluorochromem. Uzyskane w badaniach własnych wyniki przeżywalności zarodków znacznie różnią się od uzyskanych przez zespół Zhang i wsp., (2013). Autor porównał między innymi wylęgowość kurcząt z wydrążonym w jaju otworem iniekcyjnym oraz kurcząt dodatkowo iniekowanych egzogennymi transfekowanymi komórkami do tarczki zarodkowej. Wykazano wtedy znaczną różnicę (odpowiednio 35% i 5,21%) w wylęgowości kurcząt. Zatem zmniejszająca się przeżywalność zarodków może sugerować, iż iniekcja egzogennych PGCs jak i sam otwór iniekcyjny wpływają na rozwój embrionalny. W badaniach własnych co prawda nie doprowadzono do wylęgu piskląt, jednak uzyskana, w porównaniu do przytoczonych prac, znacznie wyższa przeżywalność zarodków w 6. dniu inkubacji (91,15% dla zarodków iniekowanych i 98,31% dla zarodków nieiniekowanych, ale z wydrążonym otworem iniekcyjnym) wskazywałaby raczej na negatywny wpływ ingerencji do krwiobiegu, aniżeli wpływ otworu iniekcyjnego. Inni autorzy podają, iż również miejsce iniekcji ma wpływ na przeżywalność manipulowanych zarodków (Han i wsp., 1996; Bednarczyk i wsp., 2000). W badaniach własnych zdecydowano się na nawiercanie jaj w tępych końcach. Han i wsp., (1996)

testował trzy miejsca iniekcji - ostry koniec, tępy koniec i bok jaja - pierwsza metoda okazała się być najwydajniejsza, a zachowana i nieuszkodzona komora powietrzna i podwójna warstwa parafilmu miały przyczynić się do prawidłowego rozwoju zarodka i przeżywalności w 5. dniu na poziomie 81% (Chang i wsp., 1997). Do odwrotnych wniosków doszedł zespół Bednarczyka i wsp., (2000), udowadniając wyższą wylęgowość w przypadku nawiercania w tępy niż w ostry koniec (odpowiednio 41 i 9,8%). Dużo ważniejszym czynnikiem od miejsca iniekcji jest też wysoka sterylność wykonania zabiegu, uzyskana w badaniach własnych dzięki wykorzystaniu komory laminarnej oraz wcześniejszego odkażania skorupy jaj 75% alkoholem etylowym, przemywania drążonej powierzchni roztworem antybiotyku oraz wcześniejszej sterylizacji parafilmu pod promieniami UV.

4.3. METODA STERYLIZACJI ZARODKÓW BIORCÓW, POPRZEDZAJĄCA INIEKCJĘ EGZOGENNYCH PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH I JEJ WPŁYW NA PRZEŻYwalNOŚĆ I ROZWÓJ ZARODKÓW BIORCÓW

4.3.1. Optymalizacja dawki treosulfanu iniekowanego do jaja na dwa sposoby

Celem tego etapu badań była propozycja nowej wydajnej metody sterylizacji zarodków biorców, umożliwiająca lepsze warunki konkurencji egzogennym PGCs. Zabieg sterylizacji zarodków wykonuje się w celu pozbawienia ich endogennych PGCs. Wykazano, iż usunięcie PGCs ze stadium X tarczki zarodkowej spowodowało zmniejszenie liczby PGCs gospodarza i zwiększenie transmisji zarodkowej po przeniesieniu komórek blastodermalnych dawcy (Kagami i wsp., 1997). Z kolei usunięcie krążących we krwi PGCs bezpośrednio przed wprowadzeniem "nowych" komórek, spowodowało jedynie nieznaczne zwiększenie poziomu transmisji germinalnej. Powodem tego jest niewielka ilość krwi odprowadzanej z zarodka (ok. jedna trzecia) i pozostawienie znacznej liczby nietkniętych endogennych PGCs (Naito i wsp., 1994). Z kolei naświetlanie zarodków promieniami UV powoduje spadek liczby endogennych PGCs do mniej niż 30% komórek grupy kontrolnej - niesterylizowanej (Aige-Gil i Simkiss, 1991a) oraz zwiększa śmiertelność i występowanie anomalii rozwojowych zarodków.

Zbliżone efekty przynosi promieniowanie γ . Należy zaznaczyć, iż wyniki zmieniają się odpowiednio do dawki promieniowania (Park i wsp., 2010). Naświetlanie z różną siłą zarodków kurzych i przepiórczych promieniami X przynosi podobne rezultaty (Li i wsp., 2001; Atsumi i wsp., 2008; Nakamura i wsp., 2012). Dowiedziono, że mikromagnetyczne fale hamują aktywność mitotyczną endogennych PGCs, skutkując zwiększoną proliferacją egzogennych PGCs w gonadach zarodków chimer (Atsumi i wsp., 2009). W

efekcie zwiększa się proporcja wprowadzonych PGCs do PGCs biorcy jak i stopień transmisji zarodkowej (Nakamura i wsp., 2012).

Stopień chimeryzmu płciowego oraz wielkość transmisji germinalnej może zostać zwiększona przez sterylizację zarodków biorców przy pomocy substancji chemicznych o charakterze cytostatyków (Nakamura i wsp., 2010). Pod kątem takich właściwości badano jedynie busulfan (Song i wsp., 2005) i tamoxifen (Mohsen i Ahmed, 2002). Efektywność sterylizacji busulfanem jest wysoka, ale bardzo zróżnicowana ze względu na trudność podania stałej, powtarzalnej dawki cytostatyka do zarodka. Poza tym resztki busulfanu pozostające w embrionie mogą spowodować apoptozę egzogennych PGCs (Nakamura i wsp., 2013). Inne badania wykazały, iż podanie busulfanu zarodkowi we wczesnych etapach jego rozwoju, zahamowuje eliminację egzogennych PGCs, umożliwiając normalny rozwój zarodka (Nakamura i wsp., 2009; Tagami i Nakamura, 2011). Innym cytostatykiem, użytym do sterylizacji zarodków kurzych jest tamoxifen (Mohsen i Ahmed, 2002). Jest to lek o działaniu anty-estrogenowym, o obniżonej zdolności do wywoływania poważnych skutków ubocznych. Podawany jednodniowym zarodkom kurzym zahamował nieznacznie migrację PGCs z regionu półksiężyca zarodkowego, dając w efekcie o ok. 16% mniejszą w porównaniu do grupy kontrolnej populację PGCs w gonadach 10 dniowych zarodków.

W pracy własnej zrezygnowano z powyższych metod ze względu na wysokie koszty aparatury do sterylizacji promieniowaniem, trudności techniczne i manualne związane z chirurgicznym usunięciem PGCs, wysoką toksyczność wymienionych wyżej substancji chemicznych, utrudnioną rozpuszczalność busulfanu oraz ze względu na niską przeżywalność zarodków i występowanie licznych anomalii rozwojowych we wszystkich wymienionych sposobach sterylizacji. Podjęto więc próbę ustanowienia nowej metody chemosterylizacji zarodków kurzych z zastosowaniem substancji chemicznej o nazwie treosulfan.

Wykorzystany w niniejszej pracy treosulfan jest strukturalnym analogiem busulfanu. Związki te pomimo, iż wykazują właściwości alkilujące, to różnią się jednak mechanizmem działania oraz aktywnością cytotoksyczną. W dostępnej literaturze nie znaleziono ani jednego przykładu zastosowania tego cytostatyka do eliminacji endogennych PGCs. Jego wybór powodowany był wcześniejszymi informacjami dotyczącymi jego zastosowania w medycynie ludzkiej (Krzemieniecki i Zygulska, 2011) do eliminacji wolno i szybko namnażających się komórek. Postanowiono zweryfikować jego aktywność cytostatyczną względem zachowania się kurzych pierwotnych komórek płciowych, równocześnie zbadano przeżywalność zarodków po aplikacji treosulfanu.

Analizując wyniki przeżywalności zarodków po sześciu dniach od podania treosulfanu, zauważyć można wyraźną zależność pomiędzy zwiększającym się stężeniem treosulfanu, a wzrastającą śmiertelnością zarodków. Podanie cytostatyka o koncentracji 2 mg/ml zwiększyło od 3 do 6,88 razy liczę

martwych zarodków, w porównaniu do grupy kontrolnej (Aqua pro injectione). Z kolei podanie treosulfanu o koncentracji 1 mg/ml spowodowało 2,25 do 3,44-krotny spadek przeżywalności zarodków. Wyniki najbardziej zbliżone do danych literaturowych (Nakamura i wsp., 2010; Lee i wsp., 2013) odnotowano w grupie TREO 0,5 i TREO 0,25. Śmiertelność zarodków w grupie TREO 0,5 była o odpowiednio 1,2 i 1,57 razy większa od śmiertelności w grupie kontrolnej. Jedynie w przypadku grupy TREO 0,25 iniekowanej pod tarczkę zarodkową zaobserwowano nieznaczny 1,2 wzrost przeżywalności w porównaniu do kontroli. W grupie iniekowanej do żółtka tym samym rozcieńczeniem treosulfanu uzyskano nieznaczny 1,1-krotny wzrost śmiertelności zarodków w odniesieniu do grupy kontrolnej. W innych badaniach, w przypadku zarodków kurzych traktowanych 100µg busulfanu, emulsyfikowanego lub nie 1% poliglicerolempolirycynoolenianu ich przeżywalność w siódmym dniu inkubacji wynosiła odpowiednio od 68,2% (1,4-krotny spadek w porównaniu do zarodków kontrolnych) do 77,65% (1,2 razy więcej niż w grupie kontrolnej), skutkując wylęgowością na poziomie od ok. 62% (Lee i wsp., 2013) do 36,4% (Nakamura i wsp., 2010). Dla porównania, Mohsen i Ahmed, (2002) wykazał, iż śmiertelność zarodków traktowanych tamoxifenem była od 1,05 do 1,31 krotnie wyższa niż w grupie kontrolnej. Istnieje zatem przypuszczenie, iż pozostające w jajach resztki treosulfanu o koncentracji większej niż 0,25 mg/ml nie ulegają szybkiej dezaktywacji i mogą negatywnie wpływać na przeżywalność zarodków. Nieznany jest także wpływ samego oleju sezamowego, więc wymagane są dalsze analizy, które potwierdziłyby te przypuszczenia.

W badaniach własnych obserwuje się dużą zależność pomiędzy zwiększającą dawką treosulfanu oraz malejącą liczbą przetrwałych PGCs. Rezultat taki świadczy o stałej, powtarzalnej ilości cytostatyka dostarczonego pod tarczkę zarodkową. Możliwe jest to dzięki całkowitemu rozpuszczeniu się substancji, co w przypadku busulfanu jest niełatwe (Aige-Gil i Simkiss, 1991b). Odnotowano także zależność pomiędzy miejscem iniekcji a liczbą endogennych PGCs. W prezentowanej pracy treosulfan został rozpuszczony w nietoksycznym środku do iniekcji - Aqua pro injectione i zemulsyfikowany za pomocą oleju sezamowego. Olej ten działał jako transporter cytostatyka, gdyż wprowadzony do żółtka o większej gęstości podpływał do góry w kierunku tarczki zarodkowej. Iniekcja bezpośrednio do blastodysku i szybszy (niż w przypadku iniekcji do żółtka) kontakt emulsji treosulfanu ze znajdującą się tam niewielką populacją PGCs wyeliminował więcej PGCs niż w przypadku drugiej grupy, gdzie cytostatyk musiał pokonać najpierw warstwę żółtka, by w końcu (drogą różnicy gęstości) dotrzeć do PGCs umiejscowionych we wnętrzu tarczki zarodkowej.

Obliczono, iż sterylizacja treosulfanem przyniosła od 48,5 % do 96,4% mniejszą liczbę PGCs w porównaniu do grupy kontrolnej. Song i wsp., (2005) podaje, iż zarodki traktowane busulfanem miały o 63,4 do 83,7% mniej PGCs niż grupa niesterylizowana. Z kolei zarodki Nakamura i wsp., (2010) posiadały

o 99,4% mniej PGCs w porównaniu do kontroli. W przypadku tamoxifenu zarodki posiadały o ok. 16 % mniej PGCs (Mohsen i Ahmed, 2002). Wymagane są jednak dalsze badania w kierunku wpływu treosulfanu na komórki somatyczne tarczki zarodkowej.

4.3.2. Sterylizacja zarodków i iniekcja pierwotnych komórek płciowych, oraz ich wpływ na przeżywalność i rozwój zarodków

W ostatnim etapie niniejszej pracy zbadano zachowanie się wyznakowanych fluorochromem pierwotnych komórek płciowych dawcy w wysterylizowanych gonadach zarodków biorców. Co ciekawe, liczba poddanych sterylizacji zarodków z obecnymi egzogennymi PGCs^{PKH26[+]} była niższa (o 14,5% - 32,28%) niż w przypadku zarodków z etapu drugiego, gdzie uzyskano nawet 54,5% chimerycznych zarodków (Tab. 8). Nawet w grupie kontrolnej, nie poddanej działaniu treosulfanu, zaobserwowano niższą (o 7,62% - 21,17%) niż w etapie drugim liczbę zarodków z wbudowanymi PGCs wyznakowanymi PKH26. Nie wykazano jednak istotnych różnic pomiędzy sposobem wprowadzenia treosulfanu i jego koncentracjami, a liczbą zarodków z obecnymi w gonadach egzogennymi PGCs^{PKH26[+]}, co wskazuje, że cytostatyki ten, w momencie iniekcji obcych PGCs nie wykazywał już letalnego wpływu na wprowadzone w trzecim dniu komórki. Taki efekt pozwolił na odbudowanie populacji PGCs przez egzogenne komórki i w przyszłości może przynieść wysoki wskaźnik transmisji germinalnej. W badaniach przeprowadzonych przez zespół Nakamura i wsp., (2010) krzyżowania testowe kurcząt traktowanych busulfanem wykazały, iż egzogenne PGCs z dużym powodzeniem wbudowały się do wysterylizowanych gonad zarodków biorców oraz, że busulfan nie wykazywał już cytotoksycznych właściwości względem wprowadzonych PGCs. W niniejszej pracy nie badano jednak wpływu treosulfanu na stopień transmisji zarodkowej, gdyż wymagałoby to przeprowadzenia lęgu chimer płciowych i utrzymywania ich do uzyskania dojrzałości płciowej, a następnie przeprowadzenia krzyżowań testowych, co znacznie wydłużyłoby czas trwania doświadczenia. Jednakże badania takie są planowane w późniejszym czasie.

Zwiększająca się dawka treosulfanu wstrzyknięta pod tarczkę zarodkową lub do kuli żółtkowej zapłodnionego jaja kurzego wpłynęła hamująco na rozwój zarodków, co objawiło się większą liczbą zamarć w pierwszej dobie, większą liczbą wylewów w drugiej dobie oraz większą liczbą zamarć w 3. dobie w porównaniu do grupy kontrolnej, która nie otrzymała tego cytostatyka. Więcej przypadków śmierci zarodkowej w pierwszych trzech dniach rozwoju obserwowano w grupie iniekowanej pod tarczkę zarodkową (23 przypadki), niż w grupie drugiej (16 przypadków). Tłumaczyć to można także tym, iż naruszenie integralności tarczki zarodkowej poprzez mechaniczne uszkodzenie kapilarą iniekcyjną może być fatalne dla delikatnej blastodermi i w konsekwencji spowodować zamarcie zarodka na tym bądź późniejszym etapie rozwoju. Samo zaś przebicie żółtka, w przypadku grupy II okazuje się również

wpływać niekorzystnie na przeżywalność embrionów w pierwszych trzech dniach rozwoju. Dodatkowa ingerencja w trzecim dniu życia embriona w postaci iniekcji PGCs wyznakowanych fluorochromem mogła również przyczynić się do nieznacznego zwiększenia śmiertelności zarodków, jednak nie zostało to potwierdzone statystycznie. Wnioskuje się zatem, iż to podanie zwiększającej się dawki cytostatyka, a nie iniekcja egzogennych PGCs wpływa na wzrost śmiertelności zarodków w powyższym przypadku.

W szóstym dniu życia zarodków oceniono morfologię zarodków pod kątem wystąpienia patologii rozwojowych. Najwięcej anomalii związane było z nieprawidłową budową gałki ocznej, z brakiem dzioba oraz z całkowitą deformacją ciała, a więc podobnie jak w pracach odnoszących się do tamoxifenu i busulfanu (Mohsen i Ahmed, 2002; Song i wsp., 2005; Yu i wsp., 2012). W badaniach Mohsen i Ahmed (2002) wykazano, iż dawki 200 i 400 µg tamoxifenu mogą być użyte do chemosterylizacji zarodków kurzych nie wpływając w większym stopniu na ich śmiertelność oraz występowanie anomalii rozwojowych (0,07% przypadków), bardzo częstych w przypadku iniekcji busulfanu. W badaniach własnych procent zarodków z anomaliami rozwojowymi w grupie kontrolnej był dużo wyższy niż w przypadku tamoxifenu (5,88%) i o prawie 10% niższy niż w przypadku większej (0,5 mg/ml) dawki treosulfanu. Pomimo, iż grupa, której zaaplikowano treosulfan o koncentracji 0,25 mg/ml charakteryzowała się pośrednimi wartościami odnośnie procenta zarodków z nieprawidłowościami budowy embrionów, to jednak nie odnotowano statystycznie istotnej zależności dawki cytostatyka na procent anomalii rozwojowych u zarodków. Istnieje także przypuszczenie, iż do powstałych anomalii przyczynić także mógł się olej sezamowy, który wykorzystany został jako nośnik roztworu treosulfanu. Wymagane są jednak dalsze badania w tym kierunku.

5. WNIOSKI

1. Zachowanie się pierwotnych komórek płciowych zależy od: sposobu ich izolacji, doboru dawcy/biorcy komórek, ich wyznakowania oraz sposobu sterylizacji zarodka.

2. Największą liczbę prawidłowych morfologicznie pierwotnych komórek płciowych (114 000; $P < 0,05$), nie tworzących agregatów uzyskano inkubując gonady nadtrawione 0,25% trypsyną-EDTA, w roztworze PBS pozbawionym jonów wapnia i magnezu.

3. Największy procent (54,5; $P < 0,01$) zarodków posiadających egzogenne, znakowane fluorochromem PKH26 pierwotne komórki płciowe odnotowano w grupie, Ross 308/zielononóżka kuropatwana, odpowiednio dawca/biorca komórek.

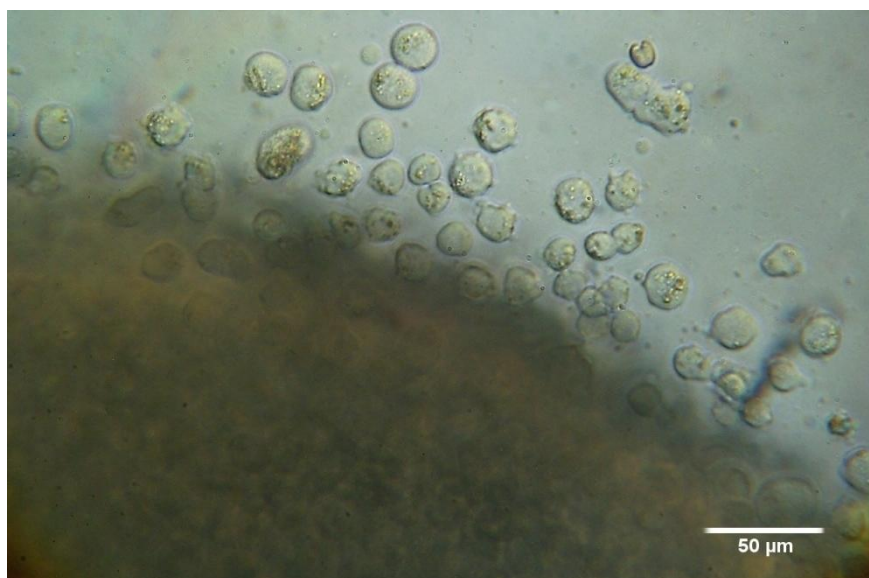
4. Cytostatyk treosulfan, zwłaszcza podany do jamy podzarodkowej, może być stosowany jako czynnik do chemicznej sterylizacji zarodków kurzych. Wraz ze wzrostem jego stężenia (koncentracja od 2 do 0,25 mg/ml) zwiększa się liczba wyeliminowanych endogennych pierwotnych komórek płciowych (od 48,5% do 96,4%), w porównaniu do grupy kontrolnej oraz maleje przeżywalność zarodków biorców, natomiast procent zarodków z egzogennymi komórkami dawcy nie ulega zmianie.

5. Cytostatyk treosulfan nie wpływa istotnie na pojawienie się potworkowości u zarodków poddanych jego działaniu.

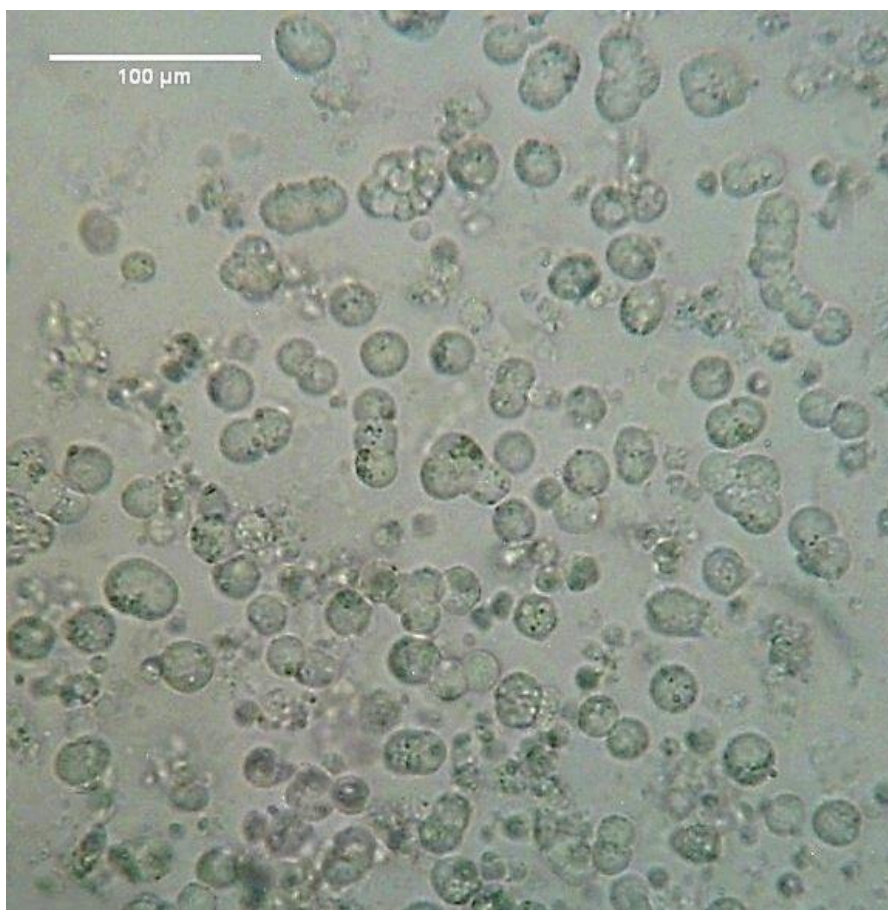
6. TABELA ILUSTRACJI



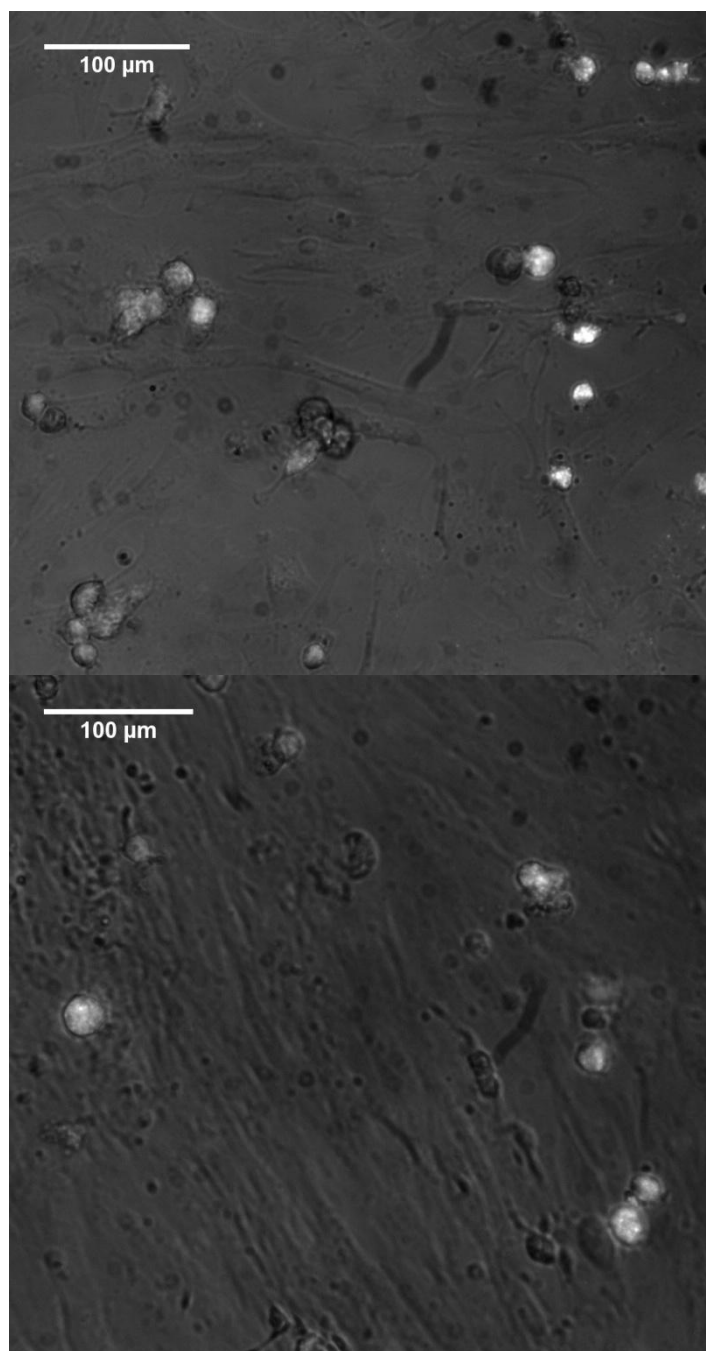
Fot.8. Gonada nienaruszona z widocznymi migrującymi komórkami PGC;
powiększenie 100x; Axiovert 40 CFL Zeiss



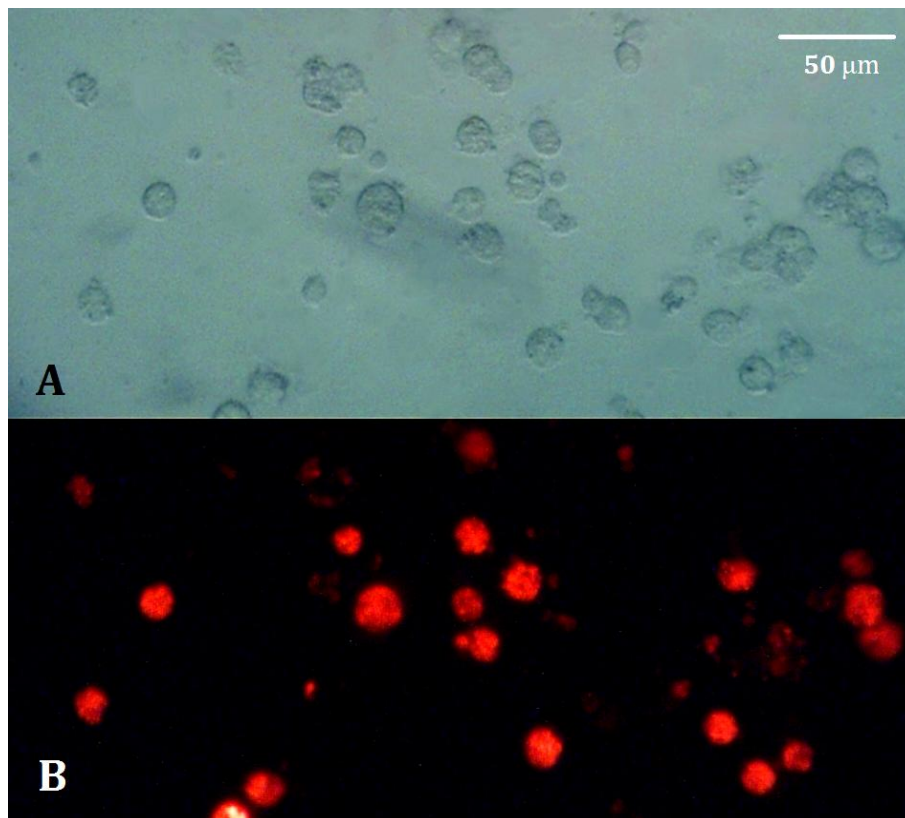
Fot. 9. Migrujące komórki PGC z gonady nienaruszonej; Axiovert 40 CFL Zeiss



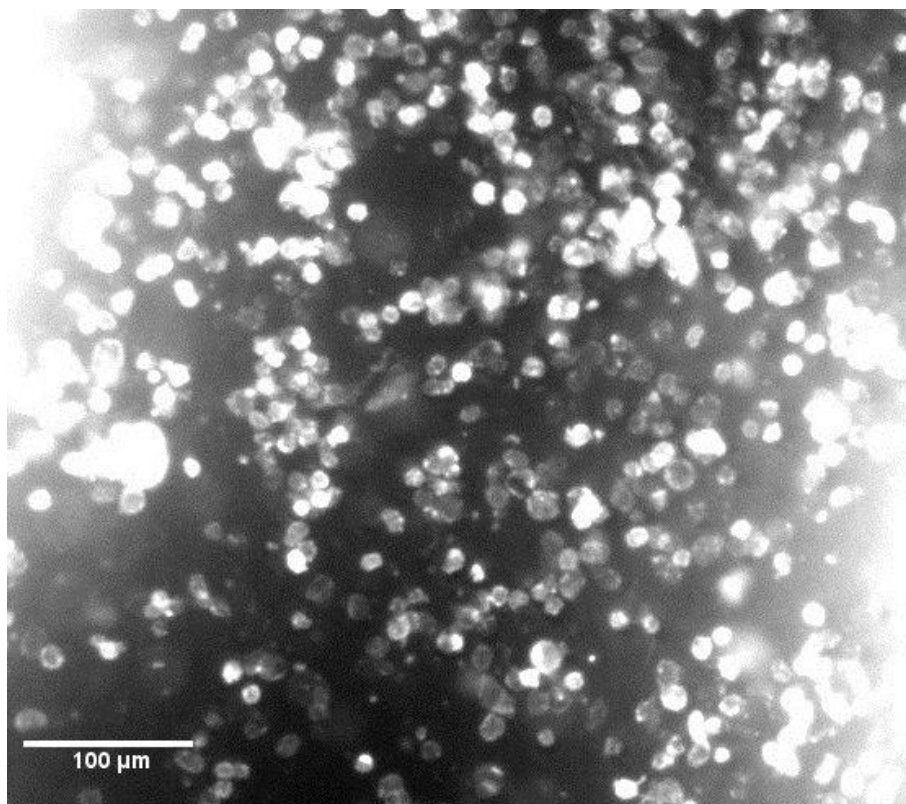
Fot. 10. PGCs niewyznakowane fluorochromem - 1 dzień hodowli *in vitro*; Axiovert 40
CFL Zeiss



Fot. 11. PGCs wyznakowane fluorochromem - 2(góra) i 3 (dół) dzień hodowli *in vitro*.
Widoczne w tle komórki fibroblastopodobne; Axiovert 40 CFL Zeiss

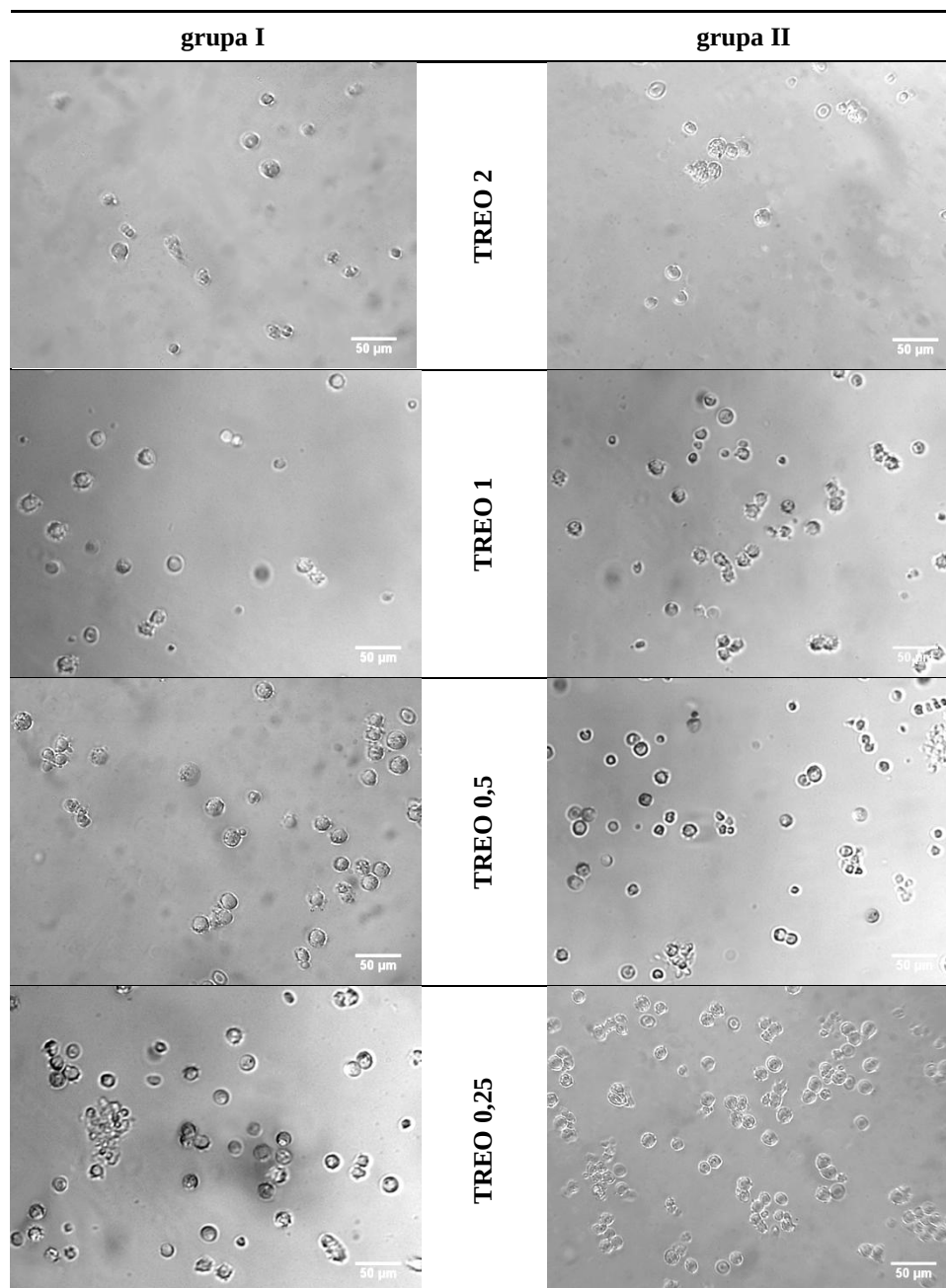


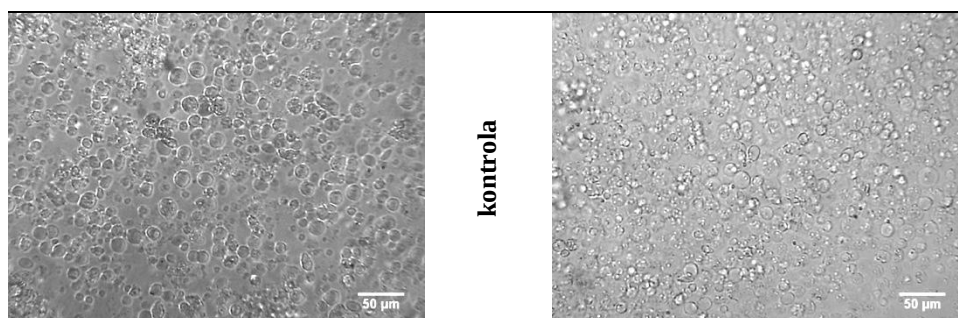
Fot. 12. Wyizolowane z gonad pierwotne komórki płciowe po wyznakowaniu PKH26;
A - światło białe; B -fluorescencja; Axiovert 40 CFL Zeiss



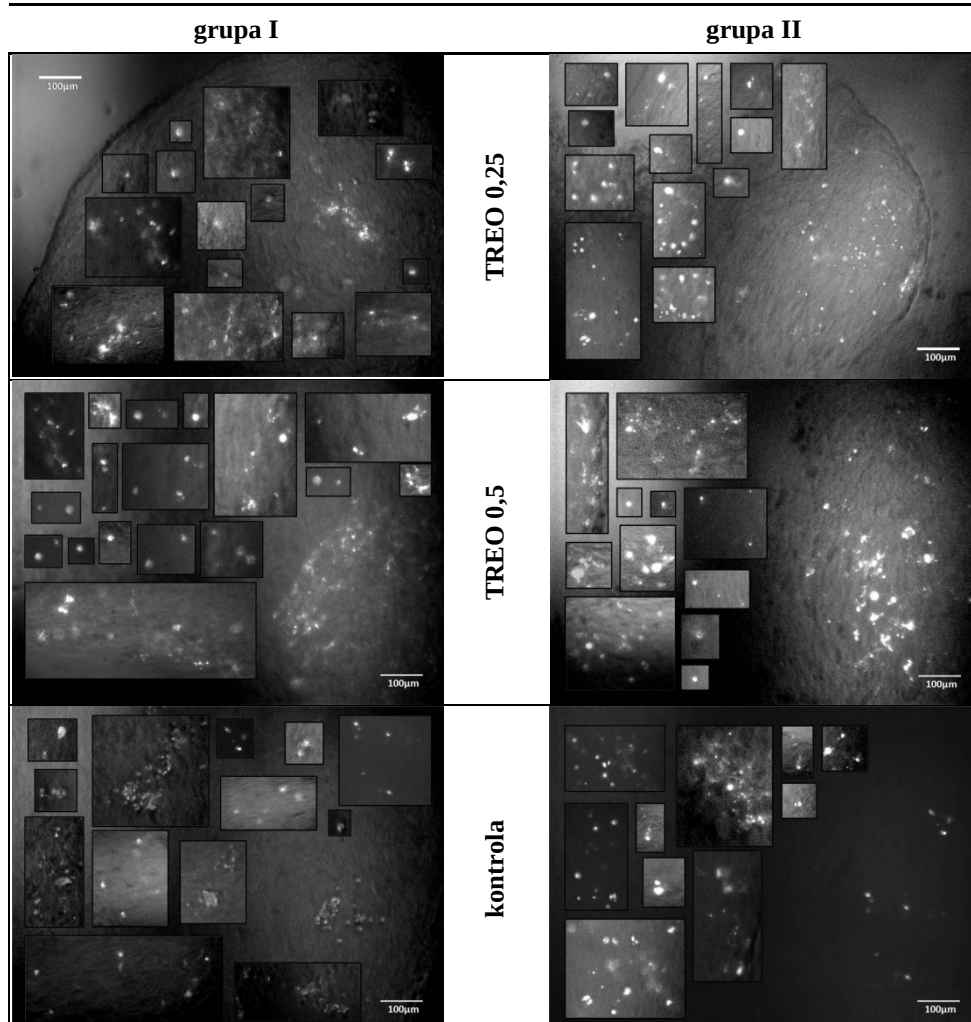
Fot. 13. Pierwotne komórki płciowe w kropli zawiesiny iniekcyjnej; Axiovert 40 CFL
Zeiss

Tab. 24. Przetrwałe PGCs z gonad sterylizowanych zarodków; Axiovert 40 CFL Zeiss



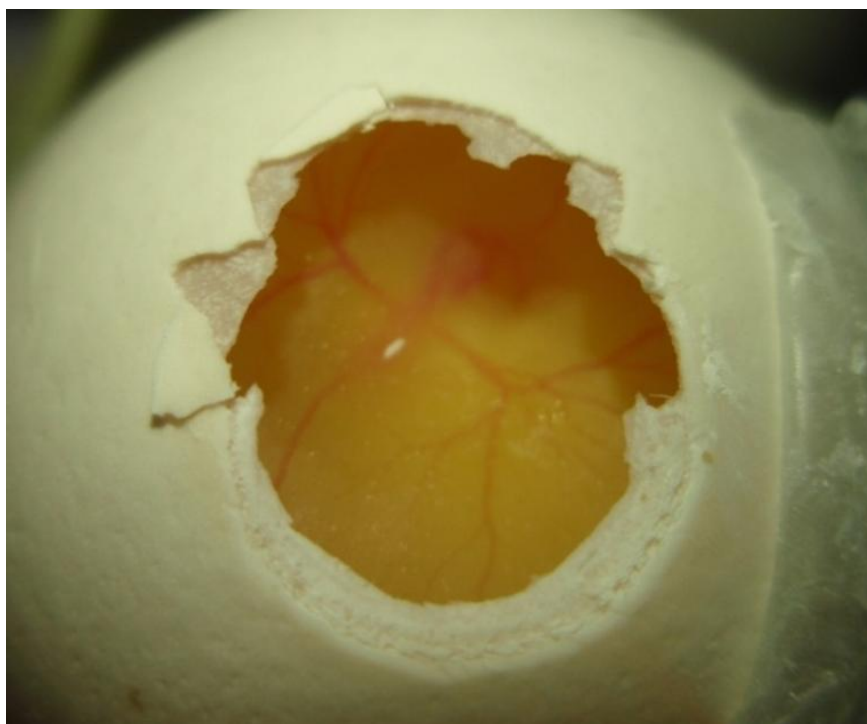


Tab. 25. Gonady wysterylizowanych zarodków biorców z widocznymi PGCs^{PKH26[+]};
Axiovert 40 CFL Zeiss

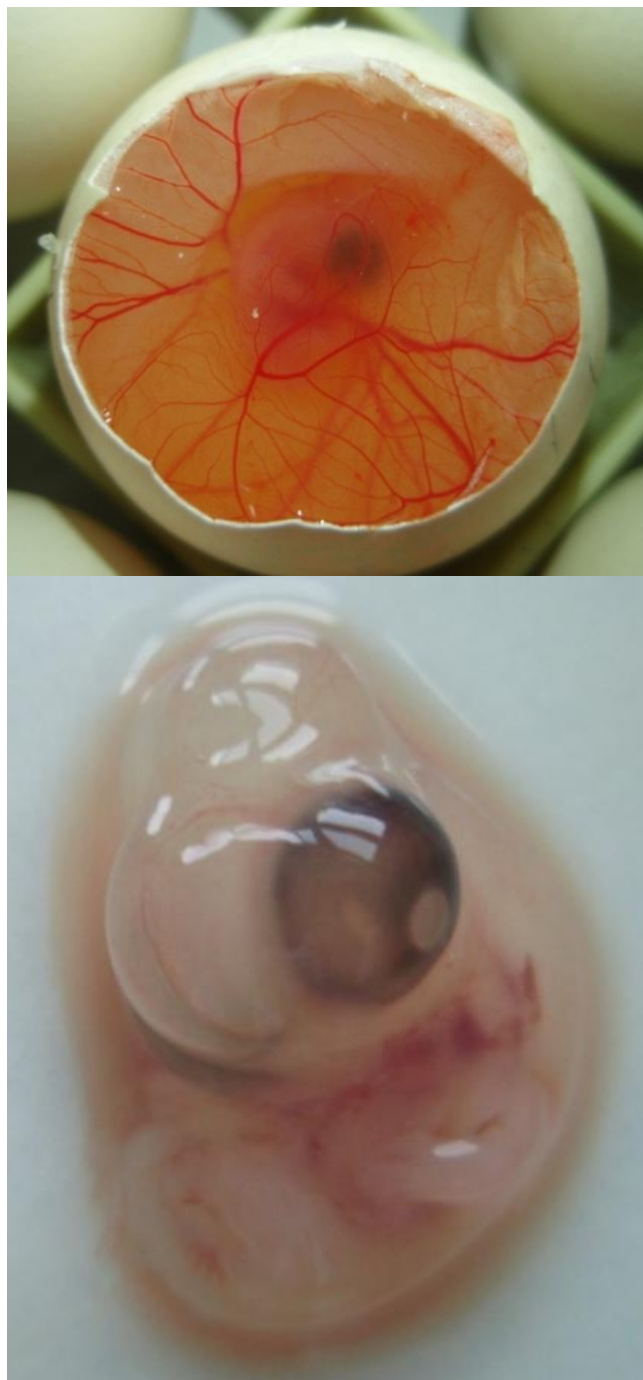




Fot. 14. Zarodek przesunięty - uniemożliwiona iniekcja

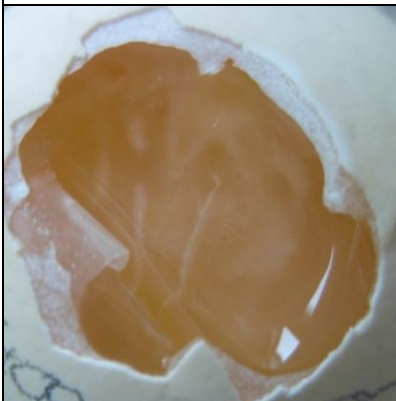
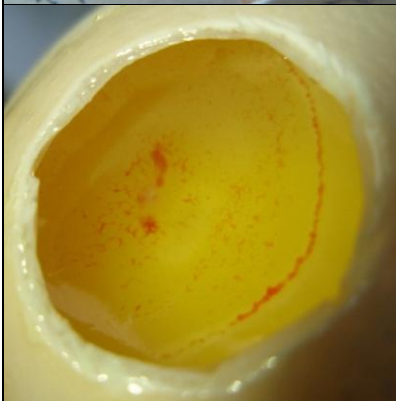
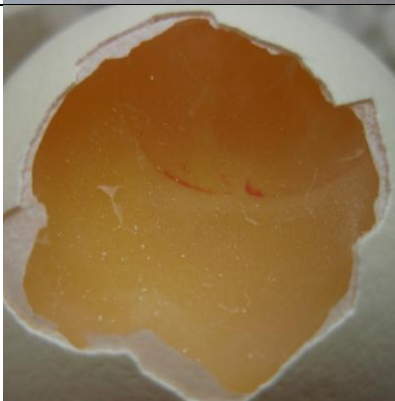
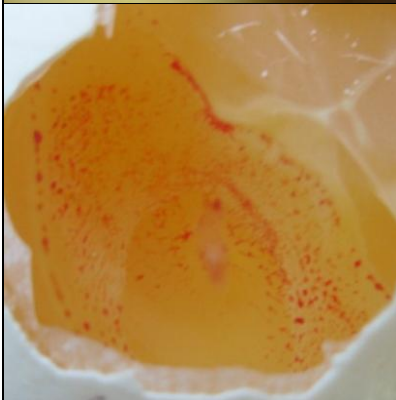
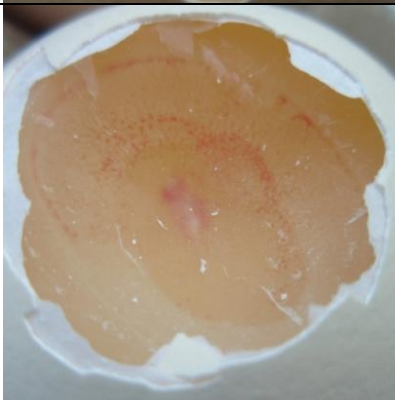


Fot. 15. Prawidłowe ułożenie i rozwój zarodka- 3. doba

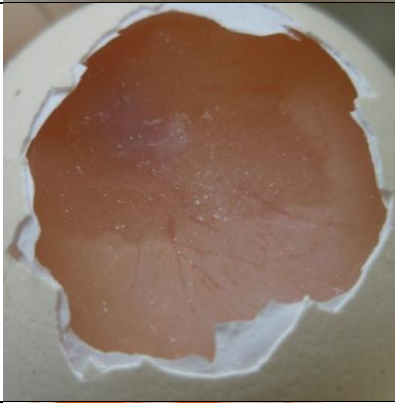
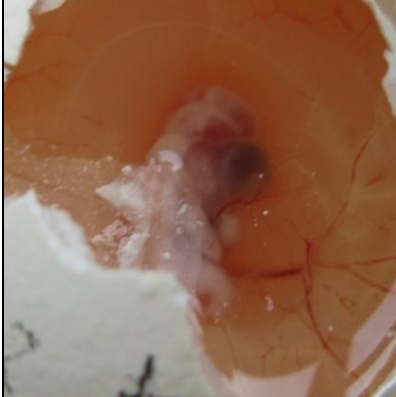
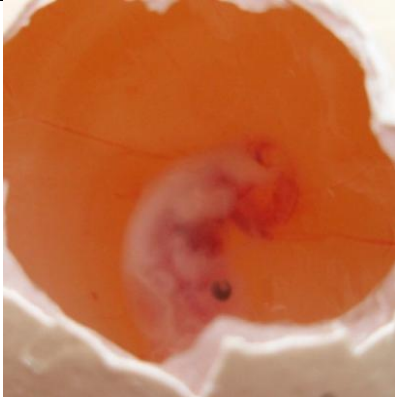


Fot. 16. Prawidłowy rozwój - 6. doba

Tab. 26. Przyczyny zamierania sterylizowanych i iniekowanych PGCs^{PKH26[+]} zarodków.

grupa I		grupa II
STERYLIZACJA		
	Brak oznak rozwoju (mętna zawartość)	
	Wylew w 2. dobie	
	Zamarcie w ok. 3 dobie	

Tab. 26. Przyczyny zamierania sterylizowanych i iniekowanych PGCs^{PKH26[+]} zarodków.

grupa I		grupa II
INIEKCJA PGCs ^{PKH26[+]}		
	Brak oznak dalszego rozwoju po iniekcji komórek	
	Zamarcie w 3-4 dobie	
	Zamarcie w 5-6 dobie	

Tab. 27. Anomalie rozwojowe 6-dniowych zarodków biorców po sterylizacji i iniekcji PGCs^{PKH26[+]}

WADY ROZWOJOWE				
	1	2	3	4
I TREO 0,25	 Oczy bardzo małe, niedorozwinięte	 Całkowita deformacja		
I TREO 0,5	 Ciało i kończyny zredukowane	 Oczy bardzo małe, niedorozwinięte		
kontrola	 Troje oczu	 Całkowita deformacja		 Brak dzioba
	4	3	2	1
II TREO 0,25		 Oczy małe, niedorozwinięte	 Brak dzioba	 Zredukowane śródmózgowie
II TREO 0,5	 Zarodek bardzo mały	 Brak dzioba	 Oczy bardzo małe, niedorozwinięte	 Oczy bardzo małe, niedorozwinięte

7. LITERATURA

- [1] Aige-Gil V., Simkiss K., 1991a. Sterilising embryos for transgenic chimaeras. *Br. Poult. Sci.* 32, 427-438.
- [2] Aige-Gil V., Simkiss K., 1991b. Sterilisation of avian embryos with busulphan. *Res. Vet. Sci.* 50, 139-144.
- [3] Alloli N., Thomas J.L., Chebloune Y., Nigon V.M., Verdier G., Legras C., 1994. Use of retroviral vectors to introduce and express the beta-galactosidase marker gene in cultured chicken primordial germ cells. *Dev Biol.* 165(1), 30-7.
- [4] Anstrom K.K., Tucker R.P., 1996. Tenascin-C lines the migratory pathways of avian primordial germ cells and hematopoietic progenitor cells. *Dev. Dynamics.* 206, 437-446.
- [5] Atsumi Y., Yazawa S., Usui F., Nakamura Y., Yamamoto Y., Tagami T., Hiramatsu K., Kagami H., Ono T., 2009. Depletion of primordial germ cells (PGCs) by X-irradiation to extraembryonic region of chicken embryos and expression of xenotransplanted quail PGCs. *J. Poult. Sci.* 46, 136-143.
- [6] Bednarczyk M., Łakota P., Siwek M., 2000. Improvement of hatchability of chicken eggs injected by blastodermal cells. *Poult. Sci.* 79, 1823-1828.
- [7] Bednarczyk M., Płucienniczak G., Płucienniczak A., Łakota P., Sochanik A., Dłużniewska P., Grajewski B., 2003. Expression of exogenous genes in blastodermal cells of chicken in vitro. *Folia Biol.* 51, 189-194.
- [8] Bernardo M. A., Sprengels K., Rodrigues G., Noce T., Chuva de Sousa Lopes S. M., 2012. Chicken primordial germ cells use the anterior vitelline veins to enter the embryonic circulation. *Biol. Open* 000, 1-7.
- [9] Brink M.H., Zwaveling J., Swen J.J., Bredius R.G.M., Lankester A.C., Guchelaar H.J., 2014. Personalized busulfan and treosulfan conditioning for pediatric stem cell transplantation: the role of pharmacogenetics and pharmacokinetics. *Drug Discov. Today* 19(10), 1572-1586.
- [10] Buzala M., Janicki B., Czarnecki R., 2015. Consequences of different growth rates in broiler breeder and layer hens on embryogenesis, metabolism and metabolic rate: A review. *Poult. Sci.* 94(4), 728-733.
- [11] Byun S.J., Kim S., Kim K.W., Kim J.S., Hwang I.S., Chung H.K., Kan I.S., Jeon I.S., Chang W.K., Park S.B., Yoo J.G., 2011. Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 75(4), 646-649.
- [12] Carsience R.S., Clark M.E., Gibbins A.M.V., Etches R.J., 1993. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117, 669-675.
- [13] Chang G., Cheng X., Li B., Ji D., Liu X., Qin Y., Chen R., Chen G., 2010. Migration and accumulation of primordial germ cells of early embryo in quail. *Ital. J. Anim. Sci.* 9, 45.

- [14] Chang I.K., Tajima A., Chikamune T., Ohno T., 1995. Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stroma cells from the germinal ridge. *Cell Biol Int.* 19(2), 143-9.
- [15] Chang I., 1992. Simple method for isolation of primordial germ cells from chick embryos. *Cell Biol. Int. Rep.* 16, 853-857.
- [16] Chang I., Jeong D.K., Hong Y.H., Park T.S., Moon Y.K., Ohno T., Han J.Y., 1997. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol. Int.* 21(8), 495-499.
- [17] Chojnacka-Puchta L., Kasperczyk K., Plucienniczak G., Sawicka D., Bednarczyk M., 2012. Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. *Pol. J. Vet. Sci.* 15(1), 173-180.
- [18] Chojnacka-Puchta L., Sawicka D., Łakota P., Plucienniczak G., Bednarczyk M., Plucienniczak A., 2015. Obtaining chicken primordial germ cells used for gene transfer: in vitro and in vivo results. *J. Appl. Genet.*, Article in Press.
- [19] Cyriac S., Churchil R.R., Gibin G., 2012. Transgenic chicken: methods and applications. *J. Indian Vet. Associ.* 10(2), 67-71.
- [20] D'Costa S., Pardue S.L., Petitte J.N., 2001. Comparative development of avian primordial germ cells and production of germ line chimeras. *Avian Poult. Biol. Rev.* 12, 151-168.
- [21] Di Carlo A., De Felici M., 2000. A role for E-cadherin in mouse primordial germ cell development. *Dev. Biol.* 226, 209-219.
- [22] Esmaeilzadeh M., Farhadi A., 2011. An overview of the basics of generate transgenic hen 'Bioreactors' . *Webmed Cent. Biol.* 2(10), 1-9.
- [23] Esmaeilzadeh M., Kazemzadeh F., 2012. Overview on the efforts to generate transgenic chicken. *Afr. J. Biotech.* 11(36), 8784-8789.
- [24] Eyal-Giladi H., Kochav S., 1976. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev. Biol.* 49, 321-337.
- [25] Eyal-Giladi H., Ginsbury M., Fabarov A., 1981. Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *Embryol. Exp. Morph.*, 65, 139-147.
- [26] Fujimoto T., Ukeshima A., Kiyofuji R., 1976. The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *Anat. Rec.* 185, 139-153.
- [27] Furuta H., Fujihara N., 1999. Proliferation of exogenously injected primordial germ cells (PGCs) into busulfan-treated chicken embryos. *Asian J. Androl.* 1, 187-190.
- [28] Gao J., Yuan F., Tang X., Han H., Sha J., Yuan J., Shao Y., Jin X., Liu H., Rui L., Li Z., 2011. Contribution of blastoderm cells to Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)-Peking duck (*Anas platyrhynchos*) chimeras. *Anim. Sci. J.* 82, 729-734.
- [29] Ge Q., McManus M.T., Nguyen T., Shen C.H., Sharp P.A., Eisen H.N., Chen J., 2003. RNA interference of influenza virus production by directly

- targeting mRNA for degradation and indirectly inhibiting all viral RNA transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 2718-2723.
- [30] Ginsburg M., Eyal-Giladi H., 1987. Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development* 101, 209-219.
 - [31] Glover J.D., Taylor L., Sherman A., Zeiger-Poli C., Sang H. M., McGrew M. J., 2013. A novel piggyBac transposon inducible expression system identifies a role for akt signalling in primordial Germ cell migration. *PLoS ONE* 8(11), 77222.
 - [32] Hamburger V., Hamilton H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88, 49-92.
 - [33] Han J.Y., Seo D.S., Shoffner R.N., Guise K.S., 1994. Manipulation of chicken primordial germ cells for transgenic chicken. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects The Sixth International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology JAAC'T'93* 6, 317-324.
 - [34] Han J.Y., 2009. Germ cells and transgenesis in chickens. *Comp. Immunol. Micro.* 32, 61-80.
 - [35] Han J.Y., Park T.S., Hong Y.H., Jeong D.K., Kim J.N., Kim K.D., Lim J.M., 2002. Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained in vitro for an extended period. *Theriogenology* 58(8), 1531-9.
 - [36] Han Y.B., Zhou Z.K.Y.Q., 1996. Studies on the cultural and isolation of primordial germ cells from blood of chick embryos. *Biol. Tech.* 6, 11-13.
 - [37] Heo Y.T., Lee S.H., Yang J.H., Kim T., Lee H.T., 2011. Bone marrow cell-mediated production of transgenic chickens. *Lab Invest.* 91(8), 1229-40.
 - [38] Hong Y.H., Seo D.S., Jeong D.K., Choi K.D., Han J.Y., 1995. Migration of the primordial germ cells and gonad formation in the early chicken embryo. *Am. J. Appl. Sci.* 8(6), 557-562.
 - [39] Ishiguro S., Minematsu T., Naito M., Kanai Y., Tajima A., 2009. Migratory ability of chicken primordial germ cells transferred into quail embryos. *J. Reprod. Develop.* 55(2), 183-186.
 - [40] Ishii Y., Reese D.E., Mikawa T., 2004. Somatic transgenesis using retroviral vectors in the chicken embryo. *Dev. Dynam.* 229, 630-642.
 - [41] Ivarie R., 2006. Competitive bioreactor hens on the horizon. *Trends Biotech.* 24, 99-101.
 - [42] Jeong D.K., Han J.Y., 2002. Migration activity of chicken gonadal primordial germ cells (gPGCs) and post-transfer localization of LacZ-transfected gPGCs in the embryonic gonads. *Asian Australas. J. Anim. Sci.* 15(9), 1227-1231.
 - [43] Jeong D.K., Hong Y.H., Han J.Y., 2002. Simple separation of chicken gonadal primordial germ cells with and without foreign genes. *Cell Biol. Int.* 26(7), 647-651.

- [44] Jiang F.X., Clark J., Renfree M.B., 1997. Ultrastructural characteristics of primordial germ cells and their movement to the gonadal ridges in the tammar wallaby. *Anat. Embryol. Berl.* 195, 473.
- [45] Jordan B.J., Vogel S., Stark M.R., Beckstead R.B., 2014. Expression of green fluorescent protein in the chicken using in vivo transfection of the piggyBac transposon. *J. Biotech.* 173, 86-89.
- [46] Jung J.G., Kim D.K., Park T.S., Lee S.D., Lim J.M., Han J.Y., 2005. Development of Novel Markers for the Characterization of Chicken Primordial Germ Cells. *Stem Cells* 23, 689-698.
- [47] Jung J.G., Lee Y.M., Kim J.N., Kim T.M., Shin J.H., Kim T.H., Lim J.M., Han J.Y., 2010. The reversible developmental unipotency of germ cells in chicken. *Reproduction* 139, 113-119.
- [48] Kagami H., Tagami T., Matsubara Y., Harumi T., Hanada H., Maruyama K., Sakurai M., Kuwana T., Naito M., 1997. The developmental origin of primordial germ cells and the transmission of the donor-derived gametes in mixed-sex germline chimeras to the offspring in the chicken. *Mol. Reprod. Dev.* 48, 501-510.
- [49] Kamihira M., Ono K., Esaka K., Nishijima K., Kigaku R., Komatsu H., Yamashita T., Kyogoku K., Iijima S., 2005. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *J. Virol.* 79(17), 10864-10874.
- [50] Kang S.J., Choi J.W., Kim S.Y., Park K.J., Kim T.M., Lee Y.M., Kim H., Lim J.M., Han J.Y., 2008. Reproduction of wild birds via interspecies germ cell transplantation. *Biol. Reprod.* 79, 931-937.
- [51] Kang S.J., Choi J.W., Park K.J., Lee Y.M., Kim T.M., Sohn S.H., Lim J.M., Han J.Y., 2009. Development of a pheasant interspecies primordial germ cell transfer to chicken embryo: Effect of donor cell sex on chimeric semen production. *Theriogenology* 72, 519-527.
- [52] Kang S.J., Sohn S.H., Kang K.S., Lee H.C, Lee S.K., Choi J. W., Han J. Y., 2011. Molecular and biological aspects of early germ cell development in interspecies hybrids between chickens and pheasants. *Theriogenology* 75, 696-706.
- [53] Karagenc L., Cinnamon Y., Ginsburg M., Petite J.N., 1996. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev. Genet.* 19(4), 290-301.
- [54] Karagenc L., Petite J. N., 2000. Soluble factors and the emergence of chick primordial germ cells in vitro. *Poult. Sci.* 79, 80-85.
- [55] Kim J.N., Kim M.A., Park T.S., Kim D.K., Park H.J., Ono T., Lim J.M., Han J.Y., 2004. Enriched gonadal migration of donor-derived gonadal primordial germ cells by immunomagnetic cell sorting in birds. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 81-87.
- [56] Kim J.N., Park T.S., Park S.H., Park K.J., Kim T.M., Lee S.K., Lim J.M., Han J.Y., 2010. Migration and proliferation of intact and genetically

- modified primordial germ cells and the generation of a transgenic chicken. *Biol. Reprod.* 82, 257-262.
- [57] Kim M.A., Park T.S., Kim J.N., Park H.J., Lee Y.M., Ono T., Lim J.M., Han J.Y., 2005. Production of quail (*Coturnix japonica*) germline chimeras by transfer of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Theriogenology* 63, 774-782.
 - [58] Koo B.C., Kwon M.S., Choi B.R., Kim J.H., Cho S.K., Sohn S.H., Cho E.J., Lee H.T., Chang W., Jeon I., Park J.K., Park J.B., Kim T., 2006. Production of germline transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein using a MoMLV-based retrovirus vector. *FASEB J.* 20, 2251-2260.
 - [59] Koo B.C., Kwon M.S., Choi B.R., Lee H.T., Choi H.J., Kim J., Kim N., Jeon I., Chang W., Kim T., 2004. Retrovirus-mediated gene transfer and expression of EGFP in chicken. *Mol. Reprod. Dev.* 68, 429-434.
 - [60] Koo B.C., Kwon M.S., Lee H., Kim M., Kim D., Roh J.Y., Park Y., Cui X., Kim N., Byun S.J., Kim T., 2010. Tetracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic Res.* 19, 437-447.
 - [61] Krzemieniecki K., Zygulska A.L., 2011. Treosulfan in treatment of advanced ovarian cancer and metastatic cutaneous and eyeball malignant melanoma. *Onkol. Prak. Klin.* 7(3), 127-131.
 - [62] Kunwar P.S., Siekhaus D.E., Lehmann R., 2006. In vivo migration: a germ cell perspective. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 22, 237-265.
 - [63] Kuwana T., 1993. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Develop. Growth & Differ.* 35 (3), 237-243.
 - [64] Kuwana T., Hashimoto K., Nakanishi A., Yasuda Y., Tajima A., Naito M., 1996. Long-term culture of avian embryonic cells in vitro. *Int. J. Dev. Biol.* 40(5), 1061-1064.
 - [65] Kuwana T., Rogulska T., 1999. Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage. *Cell Mol. Biol.* 45, 725-736.
 - [66] Kwon M.S., Koo B.C., Choi B.R., Lee H.T., Kim Y.H., Ryu W., Shim H., Kim J., Kim N., Kim T., 2004. Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 320, 442-448.
 - [67] Kwon M.S., Koo B.C., Choi B.R., Park Y., Lee Y.M., Suh H.S., Park Y.S., Lee H.T., Kim J., Roh J.Y., Kim N., Kim T., 2008. Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Mol. Reprod. Dev.* 75, 1120-1126.
 - [68] Lee H.C., Kim S.K., Park T.S., Rengaraj D., Park K.J., Lee H.J., Park S.B., Kim S.W., Choi S.B., Han J.Y., 2013. Compensatory proliferation of endogenous chicken primordial germ cells after elimination by busulfan treatment. *Stem Cell Res. Ther.* 4, 136.
 - [69] Lee S.H., Gupta M.K., Han D.W., Han S.Y., Uhm S.J., Kim T., Lee H.T., 2007. Development of transgenic chickens expressing human

- parathormone under the control of a ubiquitous promoter by using a retrovirus vector system¹. *Poult. Sci.* 86, 2221-2227.
- [70] Lee Y.M., Jung J.G., Kim J.N., Park T.S., Kim T.M., Shin S.S., Kang D.K., Lim J.M., Han J.Y., 2006. A testis-mediated germline chimera production based on transfer of chicken testicular cells directly into heterologous testes. *Biol. Reprod.* 75, 380-386.
 - [71] Li B.C., Chen G.H., Qin J., Wu X.S., Wu S.L., Cai Z.T., 2005. Suitable stages for isolation and culture PGC-s from chicken embryos. *Int. J. Poult. Sci.* 4 (11), 885-890.
 - [72] Li H.C., Kagami H., Matsui K., Ono, T., 2001. Restriction of proliferation of primordial germ cells by the irradiation of Japanese quail embryos with soft X-rays. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 130, 133-140.
 - [73] Li J., Lu L., 2010. Recent progress on technologies and applications of transgenic poultry. *Afr. J. Biotech.* 9(24), 3481-3488.
 - [74] Lillico S.G., McGrew M.J., Sherman A., Sang H.M., 2005. Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discov. Today* 10, 191-196.
 - [75] Lillico S.G., Sherman A., McGrew M.J., Robertson C.D., Smith J., Haslam C., 2007. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104, 1771-1776.
 - [76] Lim J.M., Kwon H.M., Kim D.K., Kim J.N., Park T.S., Ono T., Han J.Y., 2006. Selective decrease of chick embryonic primordial germ cells in vivo and in vitro by soft X-ray irradiation. *Anim. Reprod. Sci.* 95, 67-74.
 - [77] Macdonald J., Glover J.D., Taylor L., Sang H.M., McGrew M.J., 2010. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS ONE* 5, 15518.
 - [78] Macdonald J., Taylor L., Sherman A., Kawakami K., Takahashi Y., Sang H. M., McGrew M. J., 2012. Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 1466-1472.
 - [79] McGrew M.J., Sherman A., Ellard F.M., Lillico S.G., Gilhooley H.J., Kingsman A.J., Mitrophanous K.A., Sang H., 2004. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep.* 5, 728-733.
 - [80] McGrew M.J., Sherman A., Lillico S.G., Taylor L., Sang H., 2010. Functional conservation between rodents and chicken of regulatory sequences driving skeletal muscle gene expression in transgenic chickens. *BMC Dev. Biol.* 10, 26.
 - [81] Meyer D.B., 1960. Application of periodic acid-Schiff technique to whole chick embryos. *Stain Technol.* 35, 83-89.
 - [82] Meyer D.B., 1964. The migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Dev. Biol.* 10, 154-190.

- [83] Minematsu T., Tajima A., Kanai Y., 2004. The migratory ability of gonadal germ cells in the domestic chicken. *J. Poult. Sci.* 41, 178-185.
- [84] Miyahara D., Mori T., Makino R., Nakamura Y., Oishi I., Ono T., Nirasawa K., Tagami T., Kagami H., 2014. Culture conditions for maintain propagation, long-term survival and germline transmission of chicken primordial germ cell-like cells. *J. Poult. Sci.*, 51: 87-95.
- [85] Mochizuki K., Matsui Y., 2010. Epigenetic profiles in primordial germ cells: Global modulation and fine tuning of the epigenome for acquisition of totipotency. *Develop. Growth Differ.* 52, 517-525.
- [86] Mohsen G.A.M., Ahmed R.A.L., 2002. Tamoxifen inhibits the migration of the primordial germ cells of the chick embryos with less mortality rate. *Pakistan J. Biol. Sci.* 5(10), 1060-1062.
- [87] Motono M., Komatsu H., Kawabe Y., Nishijima K., Iijima S., 2009. Sterilization of chicken primordial germ cells. *Anim. Cell Tech. Basic & Applied Asp.* 15, 163-168.
- [88] Motono M., Ohashi T., Nishijima K., Iijima S., 2008. Analysis of chicken primordial germ cells. *Cytotechnol.* 57(2), 199-205.
- [89] Motono M., Yamada Y., Hattori Y., Nakagawa R., Nishijima K., Iijima S., 2010. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *J. Biosci. Bioeng.* 109(4), 315-321.
- [90] Mozdziak P.E., Angerman-Stewart J., Rushton B., Pardue S.L., Petite J.N., 2005. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult. Sci.* 84, 594-600.
- [91] Mozdziak P.E., Petite J.N., 2004. Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Dev. Dynam.* 229, 414-421.
- [92] Mozdziak P.E., Wysocki R., Angerman-Stewart J., Pardue S.L., Petite J.N., 2006. Production of chick germline chimeras from fluorescence-activated cell-sorted gonocytes. *Poult. Sci.* 85, 1764-1768.
- [93] Naeemipour M., Bassami M., 2013. Isolation, culture and characterization of chicken primordial germ cells. *J. Cell Mol. Res.* 5(2), 48-53.
- [94] Naeemipour M., Hesam Dehghani H., Bassami M., Bahrami A., 2013. Expression dynamics of pluripotency genes in chicken primordial germ cells before and after colonization of the genital ridges. *Mol. Reprod. Dev.* 80, 849-861.
- [95] Naito M., 2003. Development of avian embryo manipulation techniques and their application to germ cell manipulation. *Anim. Sci. J.* 74, 157-168.
- [96] Naito M., Harumi T., Kuwana T., 2010. Long term in vitro culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood and incorporation into germline of recipient embryo. *J. Poult. Sci.* 47, 57-64.
- [97] Naito M., Matsubara Y., Harumi T., Tagami T., Kagami H., Sakurai, M., Kuwana T. 1999. Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *J. Reprod. Fertil.* 117, 291-298.

- [98] Naito M., Minematsu T., Harumi T., Kuwana T., 2007. Testicular and ovarian gonocytes from 20-day incubated chicken embryos contribute to germline lineage after transfer into bloodstream of recipient embryos. *Reproduction* 134, 577-584.
- [99] Naito M., Sakurai M., Kuwana T., 1998. Expression of exogenous DNA in the gonads of chimaeric chicken embryos produced by transfer of primordial germ cell transfected in vitro and subsequent fate of the introduced DNA. *J. Reprod. Fertil.* 113(1), 137-43.
- [100] Naito M., Sano A., Harumi T., Matsubara Y., Kuwana T., 2004. Migration of primordial germ cells isolated from embryonic blood into the gonads after transfer to stage X blastoderms and detection of germline chimaerism by PCR. *Br. Poult. Sci.* 45, 762-768.
- [101] Naito M., Sano A., Matsubara Y., Harumi T., Tagami T., Sakurai M., Kuwana T., 2001. Localization of primordial germ cells or their precursors in stage X blastoderm of chickens and their ability to differentiate into functional gametes in opposite-sex recipient gonads. *Reproduction* 121, 547-552.
- [102] Naito M., Tajima A., Yasuda Y., Kuwana T., 1994. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mol. Reprod. Dev.* 39, 153-161.
- [103] Nakajima Y., Minematsu T., Naito M., Tajima A., 2011. A new method for isolating viable gonadal germ cells from 7-dayold chick embryos. *J. Poult. Sci.* 48, 106-111.
- [104] Nakamura M., Kuwana T., Miyayama Y., Fujimoto T., 1988. Extragonadal distribution of primordial germ cells in the early chick embryo. *Anat. Rec.* 222, 90-94.
- [105] Nakamura M., Kuwana T., Miyayama Y., Yoshinaga K., Fujimoto T., 1991. Ectopic colonization of primordial germ cells in the chick embryo lacking the gonads. *Anat. Rec.* 229, 109-115.
- [106] Nakamura Y., Kagami H., Tagami T., 2013. Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Develop. Growth Differ.* 55, 20-40.
- [107] Nakamura Y., Usui F., Atsumi Y., Otomo A., Teshima A., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., Tagami T., 2009. Effects of busulfan sustained-release emulsion on depletion and repopulation of primordial germ cells in early chicken embryos. *J. Poult. Sci.* 46, 127-135.
- [108] Nakamura Y., Usui F., Miyahara D., Mori T., Ono T., Kagami H., Takeda K., Nirasawa K., Tagami T., 2012. X-irradiation removes endogenous primordial germ cells (PGCs) and increases germline transmission of donor PGCs in chimeric chickens. *J. Reprod. Dev.* 58, 432-437.
- [109] Nakamura Y., Usui F., Miyahara D., Mori T., Watanabe H., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., Tagami T., 2011. Viability and

- functionality of primordial germ cells after freeze-thaw in chickens. *J. Poult. Sci.* 48, 57-63.
- [110] Nakamura Y., Usui F., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., Tagami T., 2010. Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biol. Reprod.* 83, 130-137.
 - [111] Nakamura Y., Yamamoto Y., Usui F., Atsumi Y., Ito Y., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., Tagami T., 2008. Increased proportion of donor primordial germ cells in chimeric gonads by sterilisation of recipient embryos using busulfan sustained release emulsion in chickens. *Reprod. Fert. Develop.* 20, 900-907.
 - [112] Nakamura Y., Yamamoto Y., Usui F., Mushika T., Ono T., Setioko A. R., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., Tagami T., 2007. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult. Sci.* 86, 2182-2193.
 - [113] Nishijima K., Iijima S., 2013. Transgenic chickens. *Develop. Growth Differ.* 55, 207-216.
 - [114] Oh D.J., Lee G.M., Francis K., Palsson B.O., 1999. Phototoxicity of the fluorescent membrane dyes PKH2 and PKH26 on the human hematopoietic KG1a progenitor cell line. *Cytometry.* 36(4), 312-318.
 - [115] Oishi I., 2010. Improvement of transfection efficiency in cultured chicken primordial germ cells by percoll density gradient centrifugation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 74(12), 2426-2430.
 - [116] Ono T., Machida Y., 1999. Immunomagnetic purification of viable primordial germ cells of japanese quail (*Coturnix japonica*). *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 122, 255-259.
 - [117] Ono T., Yokoi R., Aoyama H., 1996. Transfer of male or female primordial germ cells of quail into chick embryonic gonads. *Exp. Anim.* 45(4), 347-352.
 - [118] Ono T., Yokoi R., Maeda S., Nishida T., Aoyama H., 1998a. Settlement of quail primordial germ cells in chicken gonads. *Anim. Sci. Technol.* 69, 546-555.
 - [119] Ono T., Yokoi R., Maeda S., Nishida T., Aoyama H., 1998b. Transfusion of chick primordial germ cells into quail embryos and their settlement in gonads. *Anim. Sci. Technol.* 69, 911-915.
 - [120] Park K.J., Kang S.J., Kim T.M., Lee Y.M., Lee H.C., Song G., Han J.Y., 2010. Gamma-irradiation depletes endogenous germ cells and increases donor cell distribution in chimeric chickens. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 46, 828-833.
 - [121] Park T.S., Han J.Y., 2012b. PiggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *PNAS* 109 (24), 9337-9341.
 - [122] Park T.S., Han J.Y., 2000. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol. Reprod. Dev.* 56(4), 475-482.

- [123] Park T.S., Han J.Y., 2012a. Genetic modification of chicken germ cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 1271, 104-109.
- [124] Park T.S., Han J.Y., 2013. Conservation of migration and differentiation circuits in primordial germ cells between avian species. *J. Reprod. Dev.* 59(3), 252-257.
- [125] Park T.S., Hong Y.H., Kwon S.C., Lim J.M., Han J.Y., 2003a. Birth of germline chimeras by transfer of chicken embryonic germ (EG) cells into recipient embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 65(4), 389-395.
- [126] Park T.S., Jeong D.K., Kim J.N., Song G.H., Hong Y.H., Lim J.M., Han J.Y., 2003b. Improved germline transmission in chicken chimeras produced by transplantation of gonadal primordial germ cells into recipient embryos. *Biol. Reprod.* 68, 1657-1662.
- [127] Park T. S., Lee H. C., Rengaraj D., Han J. Y., 2014. Germ cell, stem cell, and genomic modification in birds. *J. Stem. Cell. Res. Ther.* 4, 201.
- [128] Petitte J.N., Mozdziak P.E., 2007. The incredible, edible, and therapeutic egg. *PNAS* 104(6), 1739-1740.
- [129] 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, 185-189.
- [130] Rapp J.C., Harvey A.J., Speksnijder G.L., Hu W., Ivarie R., 2003. Biologically active human interferon α -2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res.* 12, 569-575.
- [131] Rashidi H., Sottile V., 2009. The chick embryo: hatching a model for contemporary biomedical research. *BioEssays* 31, 459-465.
- [132] Rehim R., Khalida N., Yusuf F., Dai F., Morosan-Puopolo G., Brand-Saberi B., 2008. Stromal-derived factor-1 (SDF-1) expression during early chick development. *Int. J. Dev. Biol.* 52, 87-92.
- [133] Reynaud G., 1976. Localization study of primordial germ-cells in embryos of Japanese quail by means of ultraviolet-irradiation. *C. R. Hebd. Seanc. Acad. Sci. D* 282, 1195-1198.
- [134] Sang H.M. 2009. Genetic modification of the chicken: new technologies with potential applications in poultry production. [W:] *Genetic modification and poultry production. Biology of breeding poultry*, Hocking P. M. (red.). CAB International
- [135] Sang H., 2003. Genetically modified livestock and poultry and their potential effects on human health and nutrition. *Trends Food Sci. Tech.* 14, 253-263.
- [136] Sang H., 2006. Transgenesis sunny - side up. *Nat. Biotechnol.* 24, 955-956.
- [137] Sang H., 2012. Disease resistance and other applications of transgenesis in the chicken. *Reprod. Fert. Develop.* 25(1), 320-320.
- [138] Sawicka D., Chojnacka-Puchta L., Zieliński M., Plucienniczak G., Plucienniczak A., Bednarczyk M., 2015. Flow cytometric analysis of apoptosis in cryoconserved chicken primordial germ cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 20(1), 143-159.

- [139] Shin S.S., Kim T.M., Kim S.Y., Kim T.W., Seo H.W., Lee S.K., Kwon S.C., Lee G.S., Kim H., Lim J.M., Han J.Y., 2008. Generation of transgenic quail through germ cell-mediated germline transmission. *FASEB J.* 22, 2435-2444.
- [140] Shiue Y-L., Tailiu J-J., Liou J-F., Lu H-T., Tai C., Shiau J-W., Chen L-R., 2009. Establishment of the long-term in vitro culture system for chicken primordial germ cells. *Reprod. Dom. Anim.* 44, 55-61.
- [141] Simkiss K. 1994. Transgenic birds. [W:] *Animals with novel genes*, Maclean N. (red.). Cambridge University Press.
- [142] Sławinska A., Siwek M.Z., Bednarczyk M.F., 2014. Effects of synbiotics injected in ovo on regulation of immune-related gene expression in adult chickens. *Am. J. Vet. Res.* 75(11), 997-1003.
- [143] Song G., Han J.Y., 2011. Avian biomodels for use as pharmaceutical bioreactors and for studying human diseases. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1229, 69-75.
- [144] Song Y., D'costa S., Pardue S.L., Petitte J.N., 2005. Production of germline chimeric chickens following the administration of a busulfan emulsion. *Mol. Reprod. Dev.* 70, 438-444.
- [145] Speksnijder G.J., Etches R.J., Verrinder Gibbins A. M., 1999. Germline chimeric chickens from facs-sorted donor cells. *Mol. Reprod. Dev.* 52, 33-42.
- [146] Stebler J., Spieler D., Slanchev K., Molyneaux K.A., Richter U., Cojocaru V., Tarabykin V., Wylie C., Kessel M., Raz E., 2004. Primordial germ cell migration in the chicken and mouse embryo: the role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Dev. Biol.* 272, 351-361.
- [147] Swartz W., 1980. Response of early chick embryos to busulfan. *Teratology* 21, 1-8.
- [148] Tagami T., Kagami H., 1998. Developmental origin of avian primordial germ cells and its unique differentiation in the gonads of mixed-sex chimeras. *Mol. Reprod. And Dev.* 50, 370-376.
- [149] Tagami T., Matsubara Y., Hananda H., Naito M., 1997. Differentiation of female chicken primordial germ cells into spermatozoa in male gonads. *Dev. Growth Differ.* 39, 267-271.
- [150] Tagami T., Nakamura Y., 2011. Improving rates of germline transmission in chimeric chickens using busulfan solubilized sustained-release emulsion. *Avian Biol. Res.* 4, 74-77.
- [151] Tajima A., Hayashi H., Kamizumi A., Ogura J., Kuwana T., Chikamune T., 1999. Study on the concentration of circulating primordial germ cells. *J. Exp. Zool.* 284(7), 759-64.
- [152] Tajima A., Naito M., Yasuda Y., Kuwana T., 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* 40, 509-519.

- [153] Tajima A., Naito M., Yasuda Y., Kuwana T., 1998. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *J. Exp. Zool.* 280, 265-267.
- [154] Tsunekawa N., Naito M., Sakai Y., Nishida T., Noce T., 2000. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127(12), 2741-2750.
- [155] Tyack S.G., Jenkins K.A., O'Neil T.E., Wise T.G., Morris K.R., Bruce M.P., McLeod S., Wade A.J., McKay J., Moore R.J., Schat K.A., Lowenthal J.W., Doran T.J., 2013. A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. *Transgenic Res.* 22, 1257-1264.
- [156] Urven L.E., Abbott U.K., Erickson C.A., 1989. Distribution of extracellular matrix in the migratory pathway of avian primordial germ cells. *Anat. Rec.* 224, 14-21.
- [157] van de Lavoie M.C., Collarini E.J., Leighton P.A., Fesler J., Lu D. R., Harriman W.D., Thiyyagasundaram T.S., Etches R.J., 2012. Interspecific germline transmission of cultured primordial germ cells. *PLoS ONE* 7(5), 35664.
- [158] van de Lavoie M.C., Diamond J.H., Leighton P.A., Mather-Love C., Heyer B.S., Bradshaw R., Kerchner A., Hooi L.T., Gessaro T.M., Swanberg S.E., Delany M.E., Etches R.J., 2006a. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441, 766-769.
- [159] van de Lavoie M.C., Mather-Love C., Leighton P., Diamond J.H., Heyer B.S., Roberts R., Zhu L., Winters-Digiaccio P., Kerchner A., Gessaro T., Swanberg S., Delany M.E., Etches R.J., 2006b. High-grade transgenic somatic chimeras from chicken embryonic stem cells. *Mech. Dev.* 123, 31-41.
- [160] Wang Y., Hou L., Li C., Guan W., Chen L., Li X., 2010. Isolation, culture and biological characteristics of primordial germ cells from Beijing fatty chicken. *J. Reprod. Develop.* 56, 303-8.
- [161] Wei Q., Croy B. A., Etches R. J., 2001. Selection of genetically modified chicken blastodermal cells by magnetic-activated cell sorting. *Poult. Sci.* 80, 1671-1678.
- [162] Wentworth B. C., Tsai H., Hallett J. H., Gonzales D. S., Rajcic-Spasojevic G., 1989. Manipulation of avian primordial germ cells and gonadal differentiation. *Poultry Sci.* 68 (7), 999-1010.
- [163] Wernery U., Liu C., Baskar V., Guerineche Z., Khazanehdari K. A., Saleem S., Kinne J., Wernery R., Griffin D. K., Chang I. K., 2010. Primordial germ cell-mediated chimera technology produces viable pure-line Houbara bustard offspring: potential for repopulating an endangered species. *PLoS ONE* 5, 15824.
- [164] Wu Y., Ge C., Zhang C., 2008. Epidermal growth factor promotes proliferation of chicken germ cells (PGCs) and differentiation potency of embryoid bodies derived from PGCs. *Cell Res.* 18, 45.

- [165] Yamaguchi H., Xi Y., Fujihara N., 2000. Inter embryonic (homo- or hetero-sexual) transfer of primordial germcells between chicken embryos. *Cytotechnology* 33, 101-108.
- [166] Yamamoto Y., Usui F., Nakamura Y., Ito Y., Tagami T., Nirasawa K., Matsubara Y., Ono T., Kagami H., 2007. A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. *Biol. Reprod.* 77, 115-119.
- [167] Yasuda Y., Tajima A., Fujimoto T., Kuwana T., 1992. A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. *J. Reprod. Fertil.* 96, 521-528.
- [168] Yu M., Guan K., Zhang C., 2011. The promoting effect of retinoic acid on proliferation of chicken primordial germ cells by increased expression of cadherin and catenins. *Amino Acids* 40, 933-941.
- [169] Yu Y., Ping G., Yanping F., Yongping Y., Shijun L., Xiuli P., Yanzhang G., 2012. Busulfan influence the survival rate of chicken embryos and the morphology of gonads. *J. Anim. Vet. Adv.* 11, 561-565.
- [170] Zhang Y., Yang H., Zhang Z., Shi Q., Wang D., Zheng M., Li B., Song J., 2013. Isolation of chicken embryonic stem cell and preparation of chicken chimeric model. *Mol. Biol. Rep.* 40, 2149-2156.
- [171] Zhao D.F., Kuwana T., 2003. Purification of avian circulating primordial germ cells by Nycodenz density gradient centrifugation. *Br. Poult. Sci.* 44, 30-35.

SUMMARY

Biology and behavior of avian primordial germ cells (PGCs) differs from those in mammals, which results in unique property - the ability to create avian germ chimeras by introducing donor PGCs into bloodstream of 3,5-day-old recipient embryos. Aim of this study was to investigate behavior of donor and recipient PGCs.

Study focuses on three aspects: 1) isolation method of gonadal PGCs from 28-29 (H&H) stage donor embryos to obtain possible highest number of non-aggregating cells; 2) examination of migratory capabilities of PGCs derived from two different breeds / types of chickens, available throughout the country (Ross 308 - R and green-legged partridge-like - GP) in the role of donor or recipient of cells - at this stage, the effectiveness of donor/recipient combinations was examined by fluorescence detection in gonads of recipient embryos; 3) elaboration a new method of partial sterilization of recipients using cytostatic - treosulfan (TREO), involving the elimination of endogenous PGCs and combination of the most efficient methods of sterilization with donor/recipient arrangement in order to create chimeric embryos, and to investigate the effect of sterilization factor on the proper development of recipients.

The result of carried out studies is the development of comprehensive system that can provide an alternative to already existing production methods of chicken germ chimeras particularly used in transgenic studies, as well as in conservation of endangered species of birds and for breeding and animal biology. During the studies 9.688×10^6 of PGCs derived from 581 6-day-old donors were isolated. Those cells were injected into 513 recipient embryos, and 130 germ chimeras were obtained. The highest number of morphologically normal, non-aggregated PGCs (114 000; $P < 0.05$) were obtained by incubating gonads (predigested with 0.25% trypsin-EDTA) in PBS[-] solution. The largest number of embryos (54.5; $P < 0.01$) with exogenous, labeled with PKH26 PGCs were in R (donor of cells)/GP (recipient of cells) group. Number of eliminated endogenous PGCs was increased (from 48.5% to 96.4%) in TREO dose-dependent manner (concentrations: 2 - 0.25 mg/ml), especially when injected into subgerminal cavity. As a result of TREO administration survival rate of embryos decreases, while percentage of embryos with exogenous donor PGCs does not change.

Behavior of PGCs depends on isolation method, applied combination of donor/recipient, their labeling and sterilization method. Implementation of these results, in particular concerning on the effects of treosulfan, in future will let to extend the knowledge about mechanism of its working, as well as increase the effectiveness of transgenic birds production with using PGCs.

Dziękuję w szczególności Franuszkowi, Pawłowi, Danusi, Johnowi, Krystynie, Mańkowi, Kołkowi i Tolkom ☺, a także Anicie, Agacie M., Agacie D., Mateuszowi, Asi, Agacie Sz. i Michalinie.