



**POLITECHNIKA
BYDGOSKA**
im. Jana i Jędrzeja Śniadeckich

RADA NAUKOWA DYSCYPLINY ZOOTECHNIKA I RYBACTWO

ROZPRAWA DOKTORSKA

w formie zbioru opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów
naukowych w dyscyplinie zootechnika i rybactwo

mgr inż. Agata Szczerba

**BADANIA NAD DŁUGOTRWAŁĄ HODOWLĄ
PIERWOTNYCH KOMÓREK PŁCIOWYCH KURY**

*Research on the long-term cultivation
of chickens primordial germ cells*

DZIEDZINA: nauki rolnicze
DYSCYPLINA: zootechnika i rybactwo

PROMOTOR

PROF. DR HAB. MAREK BEDNARCZYK
KATEDRA BIOTECHNOLOGII I GENETYKI ZWIERZĄT
WYDZIAŁ HODOWLI I BIOLOGII ZWIERZĄT
POLITECHNIKA BYDGOSKA IM. J. I J. ŚNIADECKICH

PROMOTOR POMOCNICZY

PhD TAKASHI KUWANA, Visiting Professor
SHIGA UNIVERSITY OF MEDICAL SCIENCE, JAPAN

Bydgoszcz, 2021

Źródło finansowania

Wyniki badań zaprezentowane w obu artykułach zostały sfinansowane przez Narodowe Centrum Nauki w ramach projektu nr UMO-2017/27/B/NZ9/01510 pt.: „Pierwotne komórki płciowe - nowe podejście do badań epigenetycznych u kurcząt”.

Podziękowania

*Serdecznie dziękuję Panu Promotorowi
Prof. dr. hab. Markowi Bednarczykowi za opiekę naukową,
życzliwość a także za wsparcie i wyrozumiałość.*

*Bardzo dziękuję dr. Takashi Kuwana
za wsparcie merytoryczne, cenne wskazówki, poświęcony czas
oraz wszechstronną pomoc podczas realizacji badań.*

*Pragnę również podziękować wszystkim pracownikom
Katedry Biotechnologii i Genetyki Zwierząt,
a w szczególności koleżankom: Marcie i Eli.*

SPIS TREŚCI

1. Wstęp	7
2. Wykaz artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej	9
3. Uzasadnienie spójności tematycznej cyklu publikacji rozprawy doktorskiej.....	10
3.1. Wykaz skrótów, symboli i jednostek	11
3.2. Hipoteza badawcza, cel i zakres badań	12
3.3. Materiał i metody badań	13
3.4. Wyniki	14
3.5. Dyskusja	16
3.6. Podsumowanie	18
3.7. Literatura	19
4. Streszczenie	22
5. Abstract	24
6. Załączniki	26
6.1. Kopie artykułów naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej	26
6.2. Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej	48
6.3. Oświadczenia Współautorów artykułów naukowych	49

1. WSTĘP

Kura domowa (i jej zarodek) uważana jest w biologii doświadczalnej jako jeden z organizmów modelowych. Ewolucyjnie jest łącznikiem pomiędzy kręgowcami, a ssakami. Kury/ptaki wykorzystuje się w badaniach z zakresu biologii rozwoju, embriologii, farmakologii, immunologii, medycyny regeneracyjnej, reprodukcji czy epigenetyki. Model kurzy ma sporo zalet ekonomicznych i biologicznych. Jest stosunkowo tani (zakup jak i utrzymanie), zarodek kury szybko się rozwija (21 dni do wyklucia), jest dostatecznie duży i zbliżony anatomicznie do embrionu ludzkiego (Bednarczyk i in., 2021). Ponadto, jest łatwo dostępny, możliwy do hodowli w warunkach laboratoryjnych, a przede wszystkim umożliwia izolację różnorodnych tkanek i komórek we wczesnych stadiach rozwojowych. Interesujące są zwłaszcza pierwotne komórki płciowe (ang. Primordial Germ Cells - PGCs). PGCs są prekursorami komórek rozrodczych oraz embrionalnych komórek macierzystych ptasiego zarodka, są wyjątkowe, ponieważ jako jedyne są zdolne do przekazywania z pokolenia na pokolenie informacji zapisanej w materiale genetycznym. U ptaków komórki te można zidentyfikować już podczas wczesnego rozwoju embrionalnego tj. po ok 18 godzinach inkubacji. Powstają z epiblastu i różnicują się podczas formowania się zarodka (Ginsburg i Eyal-Giladi, 1987). W X stadium rozwoju zlokalizowane są w centralnej części pola jasnego (Eyal-Giladi i Kohav, 1976). Wraz ze wzrostem przemieszczają się z tylnej części hipoblastu do przedniej, a następnie do tzw. półksiężycza zarodkowego, gdzie ich liczba ulega zwiększeniu (Simkiss, 1994; Tagami i Kagami, 1998). Następnie, wraz z rozwojem naczyń krwionośnych zaczynają krążyć w krwiobiegu (Fujimoto i in., 1976), by docelowo dotrzeć do zawiązków gonad. Tam namnażają się i zaczynają się różnicować w żeńskie i męskie komórki rozrodcze (Chojnacka-Puchta i in., 2012).

PGCs są duże, jądrowe i zwykle okrągłe, a ich wyraźny zarys i dobrze odgraniczone jądro odróżniają je od komórek somatycznych. Według Swifta (1914) ich średnica waha się od 15 μm do 22 μm w zarodku pisklęcia, choć często nie przekracza 18 μm . Potwierdza to Nakajima i in. (2011), opisując komórki o średnicy 14 – 19 μm . Jądro jest kuliste, ułożone centralnie i wyraźnie otoczone błoną. Swift (1914) stwierdził, że ma ono średnicę od 8 do 10 μm zanim komórki rozrodcze opuszczą półksiężyc rozrodczy, a następnie od 10 do 12 μm po opuszczeniu księżycza. Jądro to zawiera proporcjonalnie mniej chromatyny niż jądro komórki somatycznej. PGCs posiadają w swojej budowie również bardzo dobrze rozwinięty aparat Golgiego oraz retikulum endoplazmatyczne (Fujimoto i in., 1976). Cechą charakterystyczną jest obecność w cytoplazmie licznych ziarnistości substancji zapasowych oraz lipidów (Zhao i Kuwana, 2003).

Do ich identyfikacji, poza cechami morfologicznymi, wykorzystuje się barwienie histochemiczne PAS – Periodic Acid Schiff. Wybarwia ono glikogen na kolor purpurowy (Meyer, 1960). Barwienie to jednak nie jest przyżyciowe, co nie pozwala na dalsze wykorzystanie barwionych komórek. Innym rodzajem identyfikacji komórek są markery immunohistochemiczne takie jak przeciwciała SSEA-1 (Stage-Specific Embryonic Antigen-1), EMA-1 (Embryonic Mouse Antigen-1) (Karagenc i in., 1996), które rozpoznają antygeny glikoproteinowe na powierzchni komórek (Nakamura i in., 2007) oraz CVH (ang. Chicken Vasa Homolog – kurczęcy homolog genu vasa) wykazujący ekspresję charakterystyczną dla komórek płciowych (Tsunekawa i in., 2000; Bernardo i in., 2012; Nakamura i in., 2013). Oprócz wyżej wymienionych markerów zespół Junga i in., (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). Są to skuteczne metody, jednak bardzo kosztowne i wymagające dużego doświadczenia w pracy laboratoryjnej oraz analizie uzyskanych wyników. Należy ponadto podkreślić, że wymienione

metody identyfikacji PGCs nie zapewniają ich przeżywalności, uszczuplają więc ich niewielką dostępną pulę.

PGCs kury są komórkami pluripotentnymi, czyli mogą różnicować się do wielu rodzajów komórek, a ich właściwości ulegają zmianie. Posiadają również zdolność regeneracji - samoodnawiania się (Wu i in., 2008). PGCs to nowe i ważne narzędzie w badaniach epigenetycznych (Dunisławska i in., 2020; 2021) oraz nad reprodukcją kręgowców. Jednak, badania *in vivo* podczas migracji PGCs były rzadko podejmowane, ze względu na ograniczoną liczbę komórek. Tymczasem takie podejście metodyczne umożliwia zrozumienie podstawowych procesów dotyczących przeprogramowania epigenetycznego, pluripotencji i międzypokoleniowego dziedziczenia epigenetycznego (Bednarczyk i in., 2021).

Migracja komórek odgrywa ważną rolę w wielu zróżnicowanych procesach biologicznych. W biologii rozwoju, identyfikacja mechanizmów migracji komórek jest niezbędna do zrozumienia podstaw różnicowania się tkanek (Blackburn i Manley, 2004; Mammoto i Ingber, 2010; Herriges i Morrisey, 2014). Specyficzny system przemieszczania się kurzych/ptasich PGCs pozwala na ich izolację na różnych etapach rozwoju.

Można je izolować z blastodermi jednak ich ilość jest znikoma. Badania Petiite i in. (1990) sugerują pobranie komórek z krwi zarodków znajdujących się w stadium 13-17 (wg tabeli rozwoju embrionalnego opisaną przez V. Hamburgera i H. L. Hamiltona w 1951), a następnie koncentrację tych komórek poprzez wirowanie krwi w gradiencie Ficollu. Z przytoczonej pracy wynika, że komórek krwi w stadiach 13-17 HH jest stosunkowo niewiele, a sami autorzy nie mają przekonania, z którego stadium należałoby je pobierać aby ich koncentracja była największa.

Pierwotne komórki płciowe, jako zdolne do przekazywania informacji genetycznej pomiędzy pokoleniami, mogą być teoretycznie wykorzystane do ratowania zagrożonych gatunków. Ochrona genetyczna ptaków opiera się głównie o technikę *in situ* czyli utrzymywaniu żywych kolekcji ptaków. Jest dość kosztowną metodą oraz niesie ze sobą ryzyko utraty zmienności genetycznej, chorób zakaźnych czy katastrof ekologicznych, stąd ochrona ta powinna być również wspierana strategią *ex situ*. Do tej strategii zalicza się kriokonserwację komórek, gamet czy embrionów w celu późniejszego ich wykorzystania do odtworzenia gatunku (Molnár i in., 2019). Ochrona zagrożonych ras ptaków wymaga zachowania całego genotypu zwierzęcia. Oocyty i zygoty ptaków są bardzo bogate w lipidy, co utrudnia ich kriokonserwację. Z tego powodu ochrona ptasich zasobów genetycznych opiera się zasadniczo na kriokonserwacji nasienia. Odtworzenie genotypu w oparciu o informację zawartą w nasieniu nie jest jednak optymalne, ponieważ wymaga wielu kolejnych pokoleń inseminacji w celu przywrócenia genotypu rasy i nie zachowuje tej części informacji genetycznej zawartej w chromosomie W, specyficznym dla samicy ptaka. W związku z tym istnieje potrzeba opracowania nowych technologii reprodukcyjnych, z wykorzystaniem wydajnego systemu hodowli *in vitro* i dalszej manipulacji PGCs, które umożliwią pozyskiwanie, rozmnażanie i konserwację ptasich komórek rozrodczych (Soler, 2012).

Toteż podstawowym, praktycznym celem przedstawionego cyklu publikacji było zaproponowanie kompleksowego systemu umożliwiającego pozyskanie dostatecznej liczby funkcjonalnych PGCs poprzez optymalizację sposobu pobrania komórek oraz stadium, z którego będą pobierane komórki jak i skuteczne przeprowadzenie hodowli w celu zwiększenia ich ilości.

2. WYKAZ ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. **Szczerba A.**, Kuwana T., Bednarczyk M. Concentration and total number of circulating primordial germ cells in Green-legged Partridge-like chicken embryos, *Poultry Science* (Elsevier), 2021, 100, 1, 319-324 DOI - <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.016>, pkt. MNiSW – 140 , *Impact Factor* - 2.659
2. **Szczerba A.**, Kuwana T., Paradowska M., Bednarczyk M. In Vitro Culture of Chicken Circulating and Gonadal Primordial Germ Cells on a Somatic Feeder Layer of Avian Origin, *Animals* (MDPI), 2020, 10, 1769, DOI - <https://doi.org/10.3390/ani10101769>, pkt. MNiSW – 100 , *Impact Factor* - 2.323

Podsumowanie wskaźników cyklu publikacji:

Sumaryczna liczba punktów MNiSW = 240 pkt.

Sumaryczny *Impact Factor* = 4,982

Uzupełnieniem w/w publikacji jest zgłoszenie patentowe (P.434242): Szczerba A., Kuwana T., Bednarczyk M. „Sposób identyfikacji żywych, ptasich pierwotnych komórek płciowych”.

3. UZASADNIENIE SPÓJNOŚCI TEMATYCZNEJ CYKLU PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Problematyka badawcza niniejszej rozprawy doktorskiej dotyczy kury domowej jako przedstawiciela ptaków, uznawanej za organizm modelowy w szeroko pojętych badaniach biologicznych i medycznych. Zwłaszcza embriony kurze mają kilka zalet w porównaniu z ssakami, co czyni je znaczącymi organizmami modelowymi w ogóle, a w szczególności w badaniach podstawowych i aplikacyjnych, z wykorzystaniem pierwotnych komórek płciowych. Po uformowaniu się krążenia naczyniowego, komórki te krążą w krwiobiegu, migrując śródmiąższowo do zawiązków gonad, gdzie gromadzą się jako gonadalne komórki rozrodcze i różnicują się w spermatocyty u samców lub w oocyty u samic. To specyficzne stadium rozwojowe zarodka kurzego umożliwia relatywnie łatwą izolację PGCs z krwi i/lub z gonad wyjątkowych komórek, zdolnych do przekazywania z pokolenia na pokolenie informacji zapisanej w materiale genetycznym. Jednak wykorzystanie tych właściwości PGCs w badaniach, m.in., nad opracowaniem nowych technologii reprodukcyjnych, które umożliwią pozyskiwanie, rozmnażanie i bio-konserwację komórek rozrodczych ptaków lub w analizie zmienności i dziedziczenia kodu epigenetycznego komórek poprzez kolejne generacje jest obecnie ograniczone. Wynika ono przede wszystkim ze stosunkowo niewielkiej liczby funkcjonalnych PGCs, możliwych do uzyskania w procesie ich rutynowej identyfikacji i izolacji.

Wobec powyższego podjęto wyzwanie polegające na określeniu optymalnego czasu poboru tych komórek (publikacja 1 w wykazie), łatwej, praktycznej i przyżyciowej techniki ich identyfikacji oraz opracowaniu systemu ich proliferacji *in vitro*, który imituje normalne fizjologiczne środowisko obu typów; migrujących oraz gonadalnych (PGCs) (publikacja 2 w wykazie), w celu zwiększenia ich dostępności. Oba doświadczenia pozwoliły zweryfikować postawioną hipotezę oraz pogłębić dotychczasową wiedzę dotyczącą biologii pierwotnych komórek płciowych kury.

3.1. WYKAZ SKRÓTÓW, SYMBOLI I JEDNOSTEK

- bFGF**- basic Fibroblast Growth Factor – podstawowy czynnik wzrostu fibroblastów
- BRL** - Buffalo Rat Liver cells - komórki wątroby szczura bawolego
- cES** - chicken Embryonic Stem – kurze komórki macierzyste
- cPGCs** – circulating Primordial Germ Cells – migrujące pierwotne komórki płciowe
- CS** - chicken serum – serum kurze
- CVH** - Chicken Vasa Homolog – kurczęcy homolog do genu vasa
- EMA-1** - Embryonic Mouse Antigen-1- mysie embrionalne przeciwciało
- FGF** – Fibroblast Growth Factor – czynnik wzrostu fibroblastów
- GGCs** – Gonadal Germ Cells – gonadalne komórki płciowe
- gPGCs** – gonadal Primordial Germ Cells – gonadalne pierwotne komórki płciowe
- HH** – etap rozwoju embrionalnego piskląt wg tabeli opracowanej przez Viktora Hamburgera i Howarda L. Hamilltona
- KOSR** - Knockout Serum Replacement – zamiennik surowicy stosowany w hodowlach komórkowych
- LIF** - Leukaemia Inhibitory Factor – czynnik hamujący białaczkę
- lektyna STA** - Solanum Tuberosum Agglutinin i **DBA** - Dolichos Biflorus Agglutinin - białka lub glikoproteiny wiążące węglowodany
- PAS** – Periodic Acid Schiff- barwienie histochemiczne wykorzystujące m in. kwas nadjodowy oraz fuksynę do wybarwienia glikogenu
- PBS** – Phosphate-buffered saline – sól fizjologiczna buforowana fosforanem
- PGCs** - Primordial Germ Cells – pierwotne komórki płciowe
- SCF** - Stem Cell Factor – czynnik komórek macierzystych
- SSEA-1** – Stage Specific Embryonic Antigen-1 - specyficzny dla stadium antygen embrionalny-1, znany również jako CD15
- SSEA-3** - specyficzny dla stadium antygen embrionalny-3
- SSEA-4**- specyficzny dla stadium antygen embrionalny-4
- STO** – mysia odżywcza linia komórkowa
- Zk** – Zielononóżka kuropatwiana

3.2. HIPOTEZA BADAWCZA, CEL I ZAKRES BADAŃ

Sformułowano następującą hipotezę badawczą: **manipulacje *in vivo* oraz/lub *in vitro* wpływają na zwiększenie dostępności pierwotnych komórek płciowych ptaków.**

Poddając weryfikacji powyższą hipotezę podjęto badania, których celem była hodowla komórkowa PGCs oraz ocena właściwości funkcjonalnych, proliferowanych komórek. Aby było to możliwe wyznaczono cele szczegółowe, takie jak:

- określenie rzeczywistej liczby krążących w systemie krwionośnym PGCs możliwych do izolacji, w zależności od stadium rozwojowego zarodka (publikacja 1 w wykazie),
- opracowanie łatwej, praktycznej i przyżyciowej techniki identyfikacji PGCs,
- hodowla *in vitro* PGCs izolowanych z różnych źródeł oraz ocena właściwości (publikacja 2 w wykazie oraz zgłoszenie patentowe).

3.3. MATERIAŁ I METODY BADAŃ

W badaniach opisanych w artykule pt.: "Concentration and total number of circulating primordial germcells in Green-legged Partridge-like chicken embryos" wykorzystano zapłodnione jaja od rodzimych kur Zielononóżki kuropatwianej. Jaja inkubowano w temperaturze 37,8°C przez 48-54 godziny w celu uzyskania stadium 13-16 HH. Pobrano komórki krwi od zarodków-dawców, które zostały poddane barwieniu z użyciem barwnika PKH26. Barwienie to powoduje wyznakowanie błony komórkowej czerwonym fluorochromem, który potrafi się utrzymywać nawet do 100 dni. Po wybarwieniu, komórki krwi zostały wprowadzone przy pomocy mikrokapilary do krwioobiegu zarodków-biorców. Wszystkie zarodki, którym wstrzyknięto 1 μ l zawiesiny znakowanych komórek krwi, inkubowano dalej w 38°C przez 10 minut w celu utrzymania krążenia krwi. Zarodki, u których zaobserwowano krwotok, zostały usunięte. Po upływie określonego czasu pobrano 1 μ l krwi od zarodków biorców w celu policzenia wybarwionych komórek, a tym samym przeliczenia wszystkich pierwotnych komórek płciowych znajdujących się w krwioobiegu w określonym stadium.

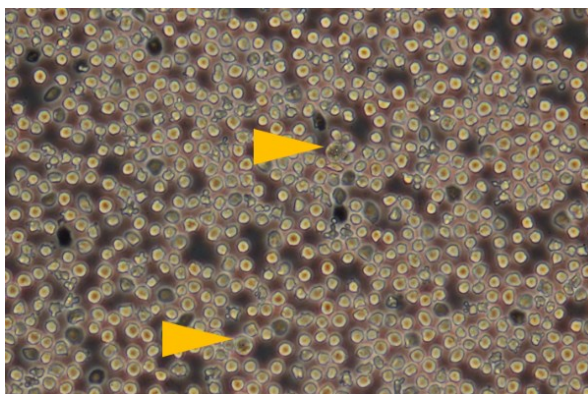
W doświadczeniu opisanym w artykule pt.: „In Vitro Culture of Chicken Circulating and Gonadal Primordial Germ Cells on a Somatic Feeder Layer of Avian Origin” wykorzystano zapłodnione jaja kur mieszańców Ross 308. Jaja inkubowano w temperaturze 38°C przez 72 godziny. Z zarodków znajdujących się w 18 stadium HH odcięto fragment zarodka znajdujący się poniżej tętnicy witelinowej. Wyizolowane tkanki poddano trypsynizacji w celu rozproszenia komórek. Następnie przygotowane komórki wysiano do dołków na 48-dołkowej płytce hodowlanej uprzednio pokrytej kolagenem. Hodowlę utrzymywano w 37,8°C, a medium zmieniano co 2-3 dni. Po pasażu komórki umieszczono w butelce hodowlanej. Po ustabilizowaniu hodowli zastosowano Mitomycynę C aby zaprzestąć dalszej proliferacji fibroblastów. W kolejnym etapie pobrano krew od inkubowanych przez 53 godziny zarodków znajdujących się w stadium 14-15 HH oraz region gonadalny od zarodków w stadium 17-18 HH. Z pobranych tkanek przygotowano zawiesiny komórek (cPGCs - circulating PGCs oraz gPGCs – gonadal PGCs) oraz nałożono je na ówczynie przygotowane hodowle *in vitro* z komórkami odżywczymi - fibroblastami. W ten sposób uzyskano podwójną hodowlę cPGCs na fibroblastach oraz gPGCs na fibroblastach. Co dwa dni zmieniano medium, a po osiągnięciu konfluencji, pasażowano hodowlę.

W celu sprawdzenia zdolności migracyjnych hodowanych pierwotnych komórek barwiono je fluorochromem PKH26. Następnie wybarwione komórki iniekowano do embrionów biorców będących w stadium 14-16 HH. Inkubowano jaja przez kolejne 5-6 dni, po czym wyizolowano gonady zarodków biorców i badano je pod mikroskopem fluorescencyjnym. Obecność świecących komórek w gonadach biorców była dowodem, iż hodowane *in vitro* pierwotne komórki płciowe zachowują swoje zdolności migracyjne z krwi do gonad.

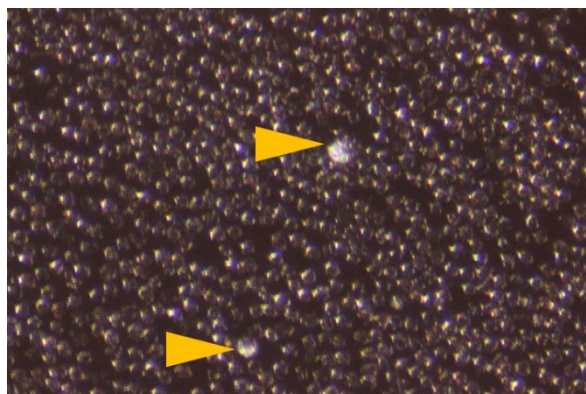
3.4. WYNIKI

W prezentowanych badaniach obliczono całkowitą objętość krwi zarodkowej na podstawie liczby komórek PKH26-dodatnich na każdym ocenianym etapie embriogenezy. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono również całkowitą liczbę cPGC w 1 ml krwi embrionalnej na każdym etapie rozwoju. Stwierdzono, że średnia objętość krwi wynosi 8.1, 20.8, 11.4 i 17.5 μl odpowiednio w etapach 13, 14, 15 i 16 HH. Liczba PGCs w 1 μl krwi zarodkowej (stężenie cPGCs) oznaczano na etapach 13 do 16 HH. Maksymalne stężenie cPGCs na 1 μl krwi zarodkowej obserwowano w stadium 14 HH (18,6 PGCs / μl). Całkowitą liczbę cPGC we krwi embrionalnej w każdym stadium embrionalnym obliczono na podstawie liczby obecnych PGCs przez μl . Najwyższą liczbę cPGC w całym krwiobiegu embrionalnym uzyskano na etapie 14 HH (386,3 PGCs / μl).

Opracowano nową, szybką i przyżyciową metodę identyfikacji PGCs. Zastosowanie ciemnego pola oraz dodatkowego źródła światła podczas obserwacji komórek przy użyciu mikroskopu odwróconego z kontrastem fazowym pozwala na łatwe rozróżnienie pierwotnych komórek płciowych od pozostałych komórek somatycznych. PGCs są widoczne jako jasne komórki kontrastujące z otaczającymi ją ciemnymi komórkami innego typu. Szczegóły metody identyfikacji PGCs opisano w zgłoszeniu patentowym o numerze P.434242.



Fot. 1. PGCs widziane po mikroskopem w świetle normalnym (pow. 200x)



Fot. 2. PGCs widziane po mikroskopem z zastosowaniem ciemnego pola widzenia zgodnie z P.434242 (pow. 200x)

Hodowlę komórkową prowadzono w kilku różnych wariantach. Pozyskano gonadalne pierwotne komórki płciowe z 18 stadium HH. Pasażowano komórki co 4-5 dni. Cechy morfologiczne pierwotnych komórek płciowych po 2 tygodniach hodowli nie uległy zmianie w porównaniu z komórkami świeżo izolowanymi. Komórki namnażały się i tworzyły małe skupiska na warstwie komórek odżywczych. Czas podwojenia ilości komórek wynosił 84 godziny. Prowadzono również hodowlę cPGCs wyizolowanych ze stadium 14-15 HH. Po izolacji komórek utrzymywano je w medium hodowlanym przez 7 dni w celu pozbycia się komórek krwi. Pod mikroskopem obserwowano małe skupiska PGCs o cechach morfologicznych świeżo izolowanych komórek. Gonadalne oraz migrujące pierwotne komórki płciowe poddane hodowli zostały wybarwione PKH26, a następnie iniekowane do krwiobiegu embrionów biorców w stadium 13-16 HH, w celu sprawdzenia zdolności migracyjnych hodowanych *in vitro* PGCs. Po 5-6 dniach od iniekcji wyizolowano gonady biorców i sprawdzono je pod mikroskopem fluorescencyjnym. Wykazywały świecenie podczas obserwacji co wskazuje na zachowanie zdolności migracyjnych hodowanych cPGCs oraz gPGCs. Zebrane gonady zostały potraktowane trypsyną w celu rozproszenia komórek. Obserwując pojedyncze komórki pod mikroskopem potwierdzono zachowanie cech

cytologicznych i morfologicznych cPGCs oraz gPGCs. Następnie poddano je 7-dniowej hodowli. Komórki obserwowano codziennie i zliczano ich liczbę. Komórki gPGCs namnażały się, ale dużo wolniej, gdyż okres podwojenia wynosił 5 dni. Po 7 dniach utrzymywania *in vitro* z jednej komórki otrzymywaliśmy trzy. cPGCs również proliferowały jednak ich krotność była dużo wyższa w porównaniu do gPGCs. Okres podwojenia wynosił ok. 2 dni.

3.5. DYSKUSJA

Dotychczasowe poglądy dotyczące liczebności PGCs w zarodkach i optymalnego stadium rozwoju umożliwiającego ich efektywną izolację były bardzo zróżnicowane. Choć w większości wcześniejszych badań, wykorzystywano popularne, komercyjne mieszańce kurcząt, na przykład Rhode Island Red (Al-Thani i Simkiss, 1991, 1992; Zhao i Kuwana, 2003), White Leghorn (Bernardo i in., 2012), White Rock (Tajima i in., 1999). W przypadku linii wsobnych lub lokalnych ras o niskiej produktywności, liczba wszystkich PGCs wydaje się być niższa niż w przypadku ras komercyjnych (Kostaman i in., 2013). Według Al-Thani i Simkiss (1991), zapłodnione jaja kurcząt rasy Rhode Island Red inkubowane w 37,5° C, najwyższe stężenie cPGC we krwi embrionalnej wykazały w stadium 16 HH. Porównanie liczby cPGCs w różnych temperaturach inkubacji (36 i 38° C) wskazywało, iż najwięcej tych komórek znajduje się w 15 stadium HH. Tajima i in. (1999) podali, że stężenie cPGC u kurcząt rasy White Rock było najwyższe w stadium 14 HH. Według Bernardo i in. (2012), migracja PGCs z regionu zarodkowego półksiężycza do krwiobiegu embrionalnego zachodzi w sposób ciągły od stadium 11 HH do 16 HH, a główny pik jest obserwowany od etapów 12 HH do 13 HH.

W badaniu własnym stwierdzono, że maksymalne stężenie cPGC u Zielononózki kuropatwianej wynosi 18,6/μl, co jest wartością mniejszą niż maksymalne stężenia obu linii niekomercyjnych (66,9 μl w 14 HH), opisanych przez Tajima i wsp., 1999) oraz linii wsobnej. (26,8 μl w 14 HH; Zhao i wsp., 2003). Niższe dane (12,1 cPGC/μl w 14 HH) przytacza (Kuwana i in., 2006) w odniesieniu do zagrożonych wyginięciem rodzimych kur w Japonii (Kureko Dori).

Należy jednak podkreślić, że w badaniach własnych stężenie cPGCs mierzono bezpośrednio. Całkowite objętości krwi embrionalnej Zielononózki kuropatwianej (Zk) obliczono na podstawie stężeń embrionalnych komórek krwi wybarwionych PKH26, które wstrzyknięto 10 minut przed procedurą pobierania krwi do tych samych embrionów w stadiach od 13 do 16 HH. Zarówno stężenie maksymalne, jak i maksimum całkowitej liczby cPGCs zaobserwowano w tym samym etapie rozwoju (stadium 14 HH). Całkowitą liczbę cPGCs w całym zarodku określa się na podstawie stężenia cPGCs i objętości krwi. Tak więc do manipulacji PGCs pochodzących od Zk zaleca się pobranie ich z zarodków znajdujących się w 14 stadium rozwoju HH, a szacowana liczba komórek obecnych na tym etapie wynosi około 380. Późniejszy spadek stężenia sugeruje, że krążące PGCs mogą być stopniowo wychwytywane przez sieci naczyń włosowatych w przyszłych obszarach gonad po stadium 15 HH. Odkrycie to potwierdza nasze wcześniejsze badania (Szczurba i in., 2019), które wykazały, że przepływ krwi w przyszłe regiony gonad odbywa się po stadium 14 HH, ponieważ w tym stadium nie ma jeszcze funkcjonalnej żyły odpływowej. We wczesnej połowie stadium 15 HH po lewej stronie gonad szybko rozwija się tylna żyła żółtkowa, a układ naczyniowy w okolicy gonad otrzymuje żyłę odpływową. Prezentowane badanie jest pierwszym doniesieniem, w którym metodą bezpośrednią, opartą na stężeniach embrionalnych krwinek wybarwionych PKH26, zmierzono całkowitą liczbę krążących PGCs u rodzimej, niekomercyjnej rasy kury (Zk), objętej programem zachowania bioróżnorodności.

Uzyskane informacje mogą przyczynić się między innymi do opracowania nowych technologii reprodukcyjnych, które umożliwią pozyskiwanie, rozmnażanie i bio-konserwację komórek rozrodczych tej unikalnej rasy kur. Mają one duże znaczenie praktyczne, ponieważ wcześniejsze badania sugerują, że Zk może być doskonałym modelem dla badań naukowych, których celem jest na przykład zrozumienie wzorców dziedziczenia i ścieżek interakcji genów leżących u podstaw mieszanych fenotypów (Siwek i in., 2013). Uważa się, że Zielononózka kuropatwiana jest niezwykle cennym modelem do badania genetycznego podłoża

odpowiedzi immunologicznych, zwłaszcza biorąc pod uwagę potencjalnie podwyższony poziom odporności u rasy Zk (Siwek i in., 2010, 2012; Sławińska i in., 2011), a także do badania możliwości stymulacji układu odpornościowego kurcząt (Sławińska i in., 2014). Badania te sugerują również, że zarodki Zk mogą być wykorzystane do realizacji kilku innych technik biotechnologicznych. Zarodek Zielononóżki kuropatwianej jest dobrym dawcą komórek embrionalnych (Sawicka i in., 2015) i dlatego jest szeroko stosowany w manipulacjach genetycznych (Bednarczyk i in., 2002; Siwek i in., 2010).

Podczas izolacji komórek i na etapie hodowli komórkowej istotnym oraz niezastąpionym elementem okazała się nieinwazyjna, prosta metoda odróżniania PGCs od innych komórek w hodowli. Przy użyciu konwencjonalnego mikroskopu świetlnego o jasnym polu, identyfikacja PGCs w niejednorodnych populacjach może być problematyczna, a komórki te mogą być mylone z innymi strukturami (czasami nawet z kropelkami lipidów). Jednak cechy strukturalne komórek generują określone warunki optyczne, które umożliwiają ich identyfikację na podstawie oświetlenia (numer zgłoszenia patentowego P.434242).

Kurze PGCs otrzymane w stadiach 14-15 i 18 HH z krwi zarodkowej lub z gonad hodowano *in vitro* na warstwach komórek odżywczych pochodzących z kurzych komórek zarodkowych. Zastosowanie warstwy odżywczej pochodzenia kurzego pozwoliło na ograniczenie ksenogenicznych czynników zwierzęcych w hodowli. W tym przypadku, w przeciwieństwie do innych badań, hodowla kurzych PGCs nie wymagała powszechnie stosowanych warstw ksenogenicznych komórek odżywczych, takich jak mysie (STO), szczurze (wątroba szczura bawolego [BRL]) lub kondycjonowana pożywką z fibroblastami szczura (van de Lavoie 2006a,b, Tonus 2016, Oishi, 2010, Miyahara 2014). Ustalono warunki utrzymania PGCs przy użyciu pożywki KAv-1 przy pH 8,0 zamiast KO-DMEM i pH 7,2. Innymi użytymi substancjami były surowica kurczaka (CS – ang. Chicken Serum – kurze serum), KOSR i bFGF. Według van de Lavoie i in. (2006), CS, SCF (ang. Stem Cells Factor - czynnik komórek macierzystych), ludzki FGF i BRL, które produkują LIF (ang. Leukemia Inhibitor Factor – czynnik hamujący białaczkę), mogą być bardzo ważnymi czynnikami w hodowli PGCs. Są one znane jako czynniki, które powodują proliferację kurzych PGCs. Woodcock i in. (2017) wykorzystali również pożywkę zawierającą CS lub pożywkę bez surowicy zawierającą transferynę komórek jajowych. Pozwoliło to zminimalizować wykorzystanie ksenobiotyków w hodowli.

Pomimo stosunkowo wysokiego pH nie obserwowano większych problemów ze wzrostem PGCs. Według Kuwany i wsp. (1996) embrionalne pH krwi *in situ* między 2 a 11 dniem inkubacji wynosi około 8,0. Oznacza to, że przy takim pH funkcjonowanie PGCs kurcząt jest fizjologicznie normalne - rozmnażają się i migrują. Warunki zastosowane w tych badaniach umożliwiły hodowlę obu typów komórek – cPGCs i gPGCs. Nieliczne badania porównywały wzrost obu typów PGCs w tych samych warunkach hodowli. Raucchi i in. (2015) porównali trzy typy komórek w podobnym układzie: zarodkowe komórki macierzyste kurczaka (ang. chicken Embryonic Stem cells - cES), cPGCs i gonadalne komórki rozrodcze (ang. Gonadal Germ Cells - GGCs). Użyli tej samej kompletnej pożywki dla ptasich macierzystych embrionów o różnych stężeniach FGF. Ich warunki umożliwiły długotrwałą hodowlę wszystkich typów komórek macierzystych (ponad 30-40 dni) i nie wpływały na reaktywność na specyficzne markery.

W przeprowadzonych doświadczeniach wykazano, że zarówno gPGCs, jak i cPGCs, które były poddane hodowli zachowały swoje właściwości migracyjne i zostały wbudowane do gonad biocy. Wymaga podkreślenia, że obie gonady zarodków biocy (lewa i prawa) zostały skolonizowane przez gPGCs i cPGCs.

3.6. PODSUMOWANIE

Przeprowadzone doświadczenia polegające na określeniu ilości krążących pierwotnych komórek płciowych w wytypowanych stadiach rozwojowych oraz przeprowadzenie hodowli wyizolowanych komórek pozwoliły na potwierdzenie postawionej hipotezy. Zaproponowane manipulacje *in vivo* oraz/lub *in vitro* wpływają na zwiększenie dostępności pierwotnych komórek płciowych ptaków a tym samym możliwa jest długotrwała hodowla tych komórek.

Ponadto doświadczenia te pozwoliły na sformułowanie szczegółowych wniosków:

- maksymalna koncentracja pierwotnych komórek płciowych krążących we krwi badanych zarodków występuje w 14 stadium HH;
- najwyższa całkowita ich liczba w całym krwiobiegu embrionalnym również w stadium 14 HH jest bliska 400 PGCs / μ l;
- identyfikacja PGCs jest możliwa bez uszczuplania ilości komórek poprzez zastosowanie nowej, szybkiej i przyżyciowej ich oceny pod mikroskopem z zastosowaniem ciemnego pola widzenia oraz dodatkowego źródła światła;
- możliwa jest hodowla gonadalnych jak i krążących pierwotnych komórek płciowych w warunkach imitujących normalne fizjologiczne środowisko z ograniczonym dodatkiem substancji ksenobiotycznych;
- hodowane PGCs zachowują swoje cechy funkcjonalne – potwierdzono zdolność migracji hodowanych komórek do gonad zarodków biorców.

3.7. LITERATURA

- [1] Al-Thani R., Simkiss K., 1991. Effects of an acute in vivo application of concanavalin A on the migration of avian primordial germ cells. *Protoplasma*, 161, 52–57.
- [2] Al-Thani R., Simkiss K., 1992. Effects of temperature on the migration of primordial germ cells in the chick embryo, *British Poultry Science*, 33(4), 735-739.
- [3] Bednarczyk M., Siwek M., Mazanowski A., Czekalski, P., 2002. DNA polymorphism in various goose lines by RAPD-PCR. *Folia Biologica (Kraków)*, 50(1-2), 45-48.
- [4] Bednarczyk M., Dunisławska A., Stadnicka K., Grochowska E., 2021. Chicken embryo as a model in epigenetic research. *Poult. Sci.*, 100(7), 101164.
- [5] Bernardo M. A., Sprekels 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.
- [6] Blackburn C.C., Manley N. R., 2004. Developing a new paradigm for thymus organogenesis. *Nat. Rev. Immunol.*, 4, 278–289.
- [7] Chojnacka-Puchta L., Kasperczyk K., Płucienniczak 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.
- [8] Dunisławska A., Szczerba A., Siwek M., Bednarczyk M., 2020. The dynamic of the PGCs transcriptome during chicken embryo development. *BMC Research Notes*, 13,441.
- [9] Dunisławska A., Siwek M., Stadnicka K., Bednarczyk M., 2021. Comparison of transcriptomic and epigenetic profile of gonadal primordial germ cells of White Leghorn and Green-legged Partridge-like embryos. *Genes*, 12(7), 1090.
- [10] Eyal-Giladi H., Kohav 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(2),321-37.
- [11] 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.
- [12] 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(2),209-19.
- [13] Hamburger V., Hamilton H.L., 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.*, 88, 49-92.
- [14] Herriges M., Morrisey E.E., 2014. Lung development: orchestrating the generation and regeneration of a complex organ. *Development*, 141,502-513.
- [15] 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.
- [16] 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.

- [17] Kostaman T., Yusuf T.L., Fahrudin M., Setiadi M.A., 2013. Isolation and number of circulated primordial germ cells (circulated-PGCs) on stages of embryonic development of Gaok chicken. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner*, 18(1),54-62.
- [18] Kuwana T., Kawashima T., Naito M., Yamashita H., Matsuzaki M., Takano T., 2006. Conservation of a Threatened Indigenous Fowl (Kureko Dori) Using the Germline Chimeras Transplanted from Primordial Germ Cells. *J Poult Sci*,43,60-66.
- [19] Mammoto T., Ingber D.E., 2010. Mechanical control of tissue and organ development. *Development*,137(9),1407-20.
- [20] Meyer D.B., 1960. Application of periodic acid-Schiff technique to whole chick embryos. *Stain Technol.*,35, 83-89.
- [21] 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.
- [22] Molnár, M., Lázár, B., Sztán, N., Végi B., Drobnyák Á., Tóth R., Liptói K., Marosán M., Gócza E., Nandi S., McGrew M.J., Várkonyi E.V., 2019. Investigation of the Guinea fowl and domestic fowl hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes. *Sci. Rep.*, 9,14284.
- [23] 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.
- [24] 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.
- [25] Nakamura Y., Kagami H., Tagami T., 2013. Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Develop. Growth Differ.* 55, 20-40.
- [26] 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.
- [27] Petite 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.
- [28] Rucci F., Fuet A., Pain B., 2015. In vitro generation and characterization of chicken long-term germ cells from different embryonic origins. *Theriogenology*, 84(5), 732-742.
- [29] Sawicka D., Chojnacka-Puchta L., Zielinski M., Plucienniczak G., Plucienniczak A., Bednarczyk M., 2015. Flow cytometric analysis of apoptosis in cryoconserved chicken primordial germ cells. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 20(1), 143-159.
- [30] Simkiss K., 1994. Transgenic birds. [W:] *Animals with novel genes*, Maclean N. (red.), Cambridge University Press.
- [31] Siwek M., Sławińska A., Łakota P., Grajewski B., Wawrzyńska M., Wiśniewska, E., Pławski A., Słomski R., Bednarczyk M., 2010. Identification of the rate of chimerism of different tissues with microsatellite markers in chicken chimeras. *Folia Biologica (Kraków)*, 58(3-4), 257-263.
- [32] Siwek M., Szyda J., Sławińska A., Bednarczyk M., 2012. Detection of two QTL on chicken chromosome 14 for keyhole lymphet heamocyanin. *J Appl Genetics*, 53, 115–119.

- [33] Siwek M., Wragg D., Sławińska A., Malek M., Hanotte O., Mwacharo J.M., 2013. Insights into the genetic history of Green-legged Partridge-like fowl: mtDNA and genome-wide SNP analysis. *Animal genetics*, 44(5), 522-532.
- [34] Sławińska A., Siwek M., Żyliński J., Bardowski J., Brzezińska J., Gulewicz K.A., Nowak M., Urbanowski M., Płowiec A., Bednarczyk M., 2014. Influence of synbiotics delivered in ovo on immune organs development and structure. *Folia Biologica (Krakow)*, 62(3), 277-285.
- [35] Soler L., Alves S., Brionne A., Jacques A., Guérin V., Cherif-Feildel M., Combes-Soia L., Fouchécourt S., Thélie A., Blesbois E., McGrew M.J., Labas V., Govoroun M.S., 2021. Protein expression reveals a molecular sexual identity of avian primordial germ cells at pre-gonadal stages. *Sci Rep* 11, 19236.
- [36] Swift C.H., 1914. Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *Am. J. Anat.*, 15, 483-516.
- [37] Szczerba A., Kuwana T., Bednarczyk M., 2019. The developmental changes in the extra-embryonic vascular system in the circulating phase of primordial germ cells in Aves. *Folia Biologica (Kraków)*, 67(2), 79-83.
- [38] 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.
- [39] 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.
- [40] Tonus C., Cloquette K., Ectors F., Piret J., Gillet L., Antoine N., Desmecht D., Vanderplasschen A., Waroux O., Grobet L., 2016. Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reproduction, Fertility and Development*, 28(5), 628-639.
- [41] 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.
- [42] 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.
- [43] 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.
- [44] Woodcock M. E., Idoko-Akoh A., McGrew M.J., 2017. Gene editing in birds takes flight. *Mammalian Genome*, 28(7), 315-323.
- [45] 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.
- [46] Zhao D.F., Kuwana T., 2003. Purification of avian circulating primordial germ cells by Nycodenz density gradient centrifugation. *Br. Poult. Sci.*, 44, 30-35.

4. STRESZCZENIE

Badania nad długotrwałą hodowlą pierwotnych komórek płciowych kury

mgr inż. Agata Szczerba

Słowa kluczowe: pierwotne komórki płciowe, cPGCs, gPGCs, kura, embrion

W biologii doświadczalnej kura jest jednym z organizmów modelowych. Wydaje się być idealna z kilku ważnych względów. Ten przedstawiciel ptaków jest łącznikiem pomiędzy kręgowcami a ssakami. Jaja są łatwo dostępne i tanie a zarodek szybko się rozwija, co więcej jest duży i zbliżony anatomicznie do ludzkiego embrionu przez co umożliwia izolację tkanek we wczesnych stadiach rozwojowych. Model kury wykorzystuje się w badaniach podstawowych oraz aplikacyjnych. Na szczególną uwagę zasługują pierwotne komórki płciowe – PGCs (ang. Primordial Germ Cells), które są prekursorami gamet. Jako jedyne mają zdolność do przekazywania informacji genetycznej z pokolenia na pokolenie. Po uformowaniu się systemu naczyniowego, krążą w krwiobiegu aby wraz z rozwojem embrionu zacząć się kolonizować w gonadach. Mając to na uwadze stały się istotnym nurtem w poszukiwaniu nowych technologii reprodukcyjnych. Te pluripotenne komórki dają wiele teoretycznych możliwości, jednak ze względu na ich ograniczoną liczbę ich wykorzystanie jest utrudnione. W związku z tym **celem niniejszej pracy było podjęcie próby przeprowadzenia hodowli komórkowej oraz ocena właściwości proliferownych komórek**, która znacząco rozwiązałaby tę kwestię. Wyznaczono cele szczegółowe, aby doprowadzić do hodowli, którymi było określenie rzeczywistej liczby krążących PGCs, określenie odpowiedniego stadium do poboru czy stworzenie łatwej i przyżyciowej techniki identyfikacji PGCs.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że średnia objętość krwi wynosi 8.1, 20.8, 11.4 i 17.5 μl odpowiednio w etapach 13, 14, 15 i 16 HH. Liczba PGCs w 1 μl krwi zarodkowej (stężenie cPGCs) oznaczano na etapach 13 do 16 HH. Maksymalne stężenie cPGCs na 1 μl krwi zarodkowej obserwowano w stadium 14 HH (18,6 PGCs / μl). Całkowitą liczbę cPGCs we krwi embrionalnej w każdym stadium embrionalnym obliczono na podstawie liczby obecnych PGCs przez μl . Najwyższą liczbę cPGCs w całym krwiobiegu embrionalnym uzyskano na etapie 14 HH (386,3 PGCs / μl).

Hodowlę komórkową prowadzono w kilku różnych wariantach. Pozyskano gonadalne pierwotne komórki płciowe z 18 stadium HH oraz cPGCs wyizolowane ze stadium 14-15 HH. Pasażowano i utrzymywano ok 2 tygodni. Gonadalne oraz migrujące pierwotne komórki płciowe

poddane hodowli zostały wybarwione PKH26, a następnie iniekowane do krwiobiegu embrionów biorców w stadium 13-16 HH, w celu sprawdzenia zdolności migracyjnych hodowanych *in vitro* PGCs. Po 5-6 dniach od iniekcji wyizolowano gonady biorców i sprawdzono je pod mikroskopem fluorescencyjnym. Wykazywały świecenie podczas obserwacji co wskazuje na zachowanie zdolności migracyjnych hodowanych cPGCs oraz gPGCs. Zebrane gonady zostały potraktowane trypsyną w celu rozproszenia komórek. Obserwując pojedyncze komórki pod mikroskopem potwierdzono zachowanie cech cytologicznych i morfologicznych cPGCs oraz gPGCs. Następnie poddano je 7-dniowej hodowli. Komórki obserwowano codziennie i zliczano ich liczbę. Komórki gPGCs namnażały się ale dużo wolniej, gdyż okres podwojenia wynosił 5 dni. Po 7 dniach utrzymywania *in vitro* z jednej komórki otrzymywaliśmy trzy. cPGCs również proliferowały jednak ich krotność była dużo wyższa w porównaniu do gPGCs. Okres podwojenia wynosił około 2 dni.

5. ABSTRACT

Research on the long-term cultivation of chickens primordial germ cells

Agata Szczerba, M.Sc.

Key words: primordial germ cells, cPGCs, gPGCs, chicken, embryo

In experimental biology, the chicken is one of the model organisms. It seems to be the perfect model for several important reasons. This representative of birds is the link between vertebrates and mammals. Eggs are easily available and cheap, and the embryo develops quickly, moreover, it is large and anatomically similar to a human embryo, which allows for the isolation of tissues at an early stage of development. The chicken model is used in basic and applied research. Primordial Germ Cells - PGCs, which are precursors of gametes, deserve special attention. They are the only ones capable of transmitting genetic information from generation to generation. After the formation of the vascular system, they circulate in the bloodstream to begin the colonization process in the gonads as the embryo grows. With this in mind, they have become an important trend in the search for new reproductive technologies. These pluripotent cells offer many theoretical possibilities, however, due to their limited number, their use is difficult. Therefore, **the aim of this study was to attempt to conduct a cell culture and to evaluate the proliferative properties of cells that would significantly resolve this issue.** Specific goals were set to lead to breeding, which was to determine the actual number of circulating PGCs, to determine the appropriate stage for collection, or to create an easy and viable technique for PGCs identification.

On the basis of the conducted experiments, it was found that the mean blood volume was 8.1, 20.8, 11.4, and 17.5 μl in stages 13, 14, 15, and 16 of HH, respectively. The number of PGCs in 1 μl of embryonic blood (concentration of cPGCs) was determined in stages 13 to 16 of HH. The maximum concentration of cPGCs per 1 μl of embryonic blood was observed at stage 14 HH (18.6 PGCs / μl). The total number of cPGCs in embryonic blood at each embryonic stage was calculated from the number of PGCs present per μl . The highest number of cPGCs in the entire embryonic bloodstream was obtained at stage 14 of HH (386.3 PGCs / μl).

Cell culture was carried out in several different variants. 18 HH stage gonadal primordial germ cells and 14-15 HH stage cPGCs were obtained. Passaged and kept for about 2 weeks. The gonadal and migrating cultured primordial germ cells were stained with PKH26 and then injected into the bloodstream of recipient embryos at stages 13-16 HH to test the migratory capacity of in vitro cultured PGCs. Recipient gonads were isolated 5-6 days after injection and checked under a fluorescence microscope. They showed glow during observation, which indicates that the migratory capacity of the cultured cPGCs and gPGCs was preserved. Collected gonads were trypsinized to disperse the cells. Observing individual cells under the microscope, the preservation of cytological and morphological features of cPGCs and gPGCs was confirmed. Then they were cultivated for 7 days. Cells were observed daily and their numbers were counted. gPGCs multiplied but more slowly as the doubling period was 5 days. After 7 days of in vitro maintenance, three cells were obtained from one cell. cPGCs also proliferated, however, their fold was much higher compared to gPGCs. The doubling period was approximately 2 days.

6. ZAŁĄCZNIKI

6.1. KOPIE ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH STANOWIĄCYCH CYKL PUBLIKACJI ROZPRAWY DOKTORSKI

PHYSIOLOGY AND REPRODUCTION

Concentration and total number of circulating primordial germ cells in Green-legged Partridgelike chicken embryos

Agata Szczerba,¹ Takashi Kuwana, and Marek Bednarczyk

Department of Animal Biotechnology and Genetics, Faculty of Animal Breeding and Biology, University of Science and Technology in Bydgoszcz, 85-084 Bydgoszcz, Poland

ABSTRACT The Green-legged Partridgelike fowl is an old Polish indigenous breed of chicken. Primordial germ cells (PGCs) are one of the best sources of precursor cells that can be used for the conservation and proliferation of the endangered breeds of bird. Initially, the chicken PGCs colonize at the anterior extraembryonic region called “germinal crescent,” and after the establishment of blood vascular circulation, they temporarily circulate via the embryonic blood vascular system along with embryonic blood cells. They further colonize at the microcapillary networks of both right and left future gonadal regions. Subsequently, they migrate interstitially to reach gonadal anlagen, where they begin to differentiate and eventually develop into the future ova or sperm. The basic knowledge regarding the concentration and the total number of circulating PGCs (cPGCs) throughout their circulating phase in the early embryonic stages is crucial for providing an insight into the mechanisms by which they circulate

and colonize at the capillary networks of left and right future gonadal regions in each developmental stage. The present study aims to determine the most efficient developmental stage that is suitable to collect cPGCs. The concentration of cPGCs was directly measured, and total volume of embryonic blood was calculated based on the concentration of PKH26-stained embryonic blood cells which were injected 10 min before the blood sampling process in the same embryo during each stage of embryonic development from stage 13 Hamburger and Hamilton (HH; [Hamburger and Hamilton, 1951](#)) to 16 HH. Analysis of whole embryonic bloodstream revealed that at stage 14 HH of embryonic development, peak total number of cPGCs (386.3 cells/ μ L) and peak concentration of cPGCs (18.6 cells/ μ L) were observed. Later, there was a decrease in concentration, suggesting that the cPGCs might be trapped gradually by the capillary networks at the future gonadal regions after stage 15 HH.

Key words: circulating primordial germ cell, embryonic blood volume, green-legged Partridgelike chicken, endangered chicken breed

2021 Poultry Science 100:319–324
<https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.016>

INTRODUCTION

Green-legged Partridgelike (GP), native Polish chicken breed, became recognized as a breed at the end of nineteenth century. GP was a dual-purpose chicken, reared locally in central-eastern Poland as a free-range chicken. GP chickens can adapt well to extreme environmental conditions and hence are considered to be more healthy and disease resistant than other breeds ([Cywa-](#)

[Benko, 2002](#); [Witkowski et al., 2009](#)). This breed could provide a tough competition to its counterparts because of the peculiar characteristics such as hardiness, low susceptibility to unfavorable conditions, and well-developed maternal traits. In addition, immense activity and ability to use green area make the GP chick an ideal breed for free-range keeping. Both the meat and eggs of this bird are characterized by an exceptional taste.

Previous research suggests that GP can be an excellent model for academic and scientific research aimed, for example, at understanding the inheritance pattern and interaction pathways of genes underlying admixed phenotypes ([Siwek et al., 2013](#)). GP is thought to be a remarkable avian model for investigating the genetic background of immune responses, especially taking into consideration potentially elevated levels of

© 2020 The Authors. Published by Elsevier Inc. on behalf of Poultry Science Association Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Received February 25, 2020.

Accepted August 10, 2020.

¹Corresponding author: agata.szczerba@utp.edu.pl

immunity in the GP breed (Siwek et al., 2010, 2012; Sławińska et al., 2011), as well as for studying the possibility of stimulating the chicken immune system (Sławińska et al., 2014). Our investigations also suggest that GP chicken can be used to study several other approaches. The GP embryo has been a good source of embryonic cells (Sawicka et al., 2015) and hence has been extensively used for biotechnological manipulations (Bednarczyk et al., 2002; Siwek et al., 2010).

Presently, there still exists a small unregistered population of these birds, thanks to the interest of small stock breeders and to those who keep them for fancy purposes. There are 2 major GP populations that are closely related with approximately 600 females and 70 males in each group. The animals in the conservation program were kept in a flock without subjecting to any selection process for more than 50 generations. Maintaining live birds requires considerable financial investment; furthermore, the flocks are exposed to loss of genetic variability as a result of selection and genetic drift. Therefore, the *in situ* method should be supported by the *ex situ* conservation strategy (Sawicka et al., 2011). According to the current state of knowledge (Chojnacka-Puchta et al., 2012; Glover and McGrew, 2012), the *ex situ* method of avian biodiversity preservation program involves a strategy that explores the properties and possibilities of manipulating the PGCs. Moreover, PGCs have been generally used to produce transgenic chickens by a nonviral cell-based method (see the article by Bednarczyk et al., 2018, for related references) and for application in avian biotechnology (Xie et al., 2019).

Chicken PGCs represent the germline stem cells that first arise in hyperblast at the central disk region of area pellucida at stage X of embryo (Ginsburg and Eyal-Giladi, 1986). They translocate toward the anterior from the embryo proper (so-called germinal crescent region) and simultaneously undergo morphological reconstruction to form a mesodermal layer (Swift, 1914; Ginsburg and Eyal-Giladi, 1986). Just after the establishment of blood vascular circulation, they circulate temporarily via the bloodstream. PGCs colonize near the gonadal anlage and migrate interstitially into the gonadal anlage, where they finally differentiate into functional gametes (either sperm in male or ova in female).

In the circulating phase, PGCs could be quite easily isolated from the embryonic blood samples (Kuwana, 1993). However, one of the problems with the PGCs collection of embryonic blood is the low number of cells found, especially in local breed of chicken (Kostaman et al., 2013). In fact, the data with regard to the concentration of cPGCs at different stages of chicken development, essential to use them effectively, are ambiguous.

In the previous studies, high variability in cPGC numbers as well as in cPGC concentrations in embryonic bloodstream in the different breeds of chicken and at different stages of chicken embryogenesis (from 13 Hamburger and Hamilton (HH)–16 HH; Hamburger and Hamilton, 1951) has been reported (Al-Thani and Simkiss, 1991, 1992; Tajima et al., 1999; Kuwana

et al., 2006; Xie et al., 2019). In contrast, de Melo Bernardo et al. (2012) concluded that from stage 5 HH, when the PGCs are present in the germinal crescent, until stage 19 HH, when the PGCs have reached the genital ridges, the number of PGCs remained constant.

Thus, the present study aims to investigate the dynamics of circulating PGCs during the process of embryonic development and determine the most suitable and efficient developmental stage for their collection. This information might be crucial to understand the biology of circulating PGCs. Moreover, the results of the research are expected to be basic information for determining the appropriate stage for the isolation of circulating PGCs.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of Chicken Embryos

Fertilized eggs of GP chicks were supplied by Zofia i Gracjan Skórnicy—Hodowla Kur Zielononózek (Duszniki, Poland). They were incubated at 37.8°C for 48–54 h from the moment of setting eggs into the incubator, to obtain embryos of stages 13 to 16 HH (Hamburger and Hamilton, 1951).

Labeling of Embryonic Blood Cells

Embryonic blood cells were collected from embryos of stages 16 HH and washed 2 times with nonserum medium (Opti-MEM; Gibco Invitrogen Co., Grand Island, NY). The cells were labeled with PKH26 fluorescent dye (Z-PKH26-GL; Zynaxis, Malvern, PA) according to the manufacturer's instructions. After the staining process, the cells were washed twice with KAV-1 medium (Kuwana, 1993), which consists of 5% fetal bovine serum (Gibco Invitrogen Co., Grand Island, NY) and 5% chicken serum (Sigma-Aldrich, Poznan, Poland).

Measurement of Embryonic Blood Volume Through Stages 13 to 16

The eggs of the GP birds were broken; the embryos were not isolated from the yolk and collected in 100-mm plastic Petri dishes; and 1- μ L cell suspension of PKH26-labeled blood cells was injected into each embryo via the dorsal aorta by using fine glass micropipettes (Figure 1A). The fine micropipette consists of a microcapillary needle (borosilicate glass, #B-100-75-10; Sutter Instrument, Co., Ltd., Novato, CA) which is connected to a micropipette puller (P-97/IVF; Sutter Instrument, Co., Ltd.).

All embryos injected with 1 μ L of labeled blood cell suspension were further incubated at 38°C for 10 min to maintain the blood circulation, and then 1 μ L of the embryonic blood was drawn from the dorsal aorta of the embryos. In the cases where hemorrhage was noted after injection, such embryos were rejected. As shown in Figure 1B, the total embryonic blood volume of

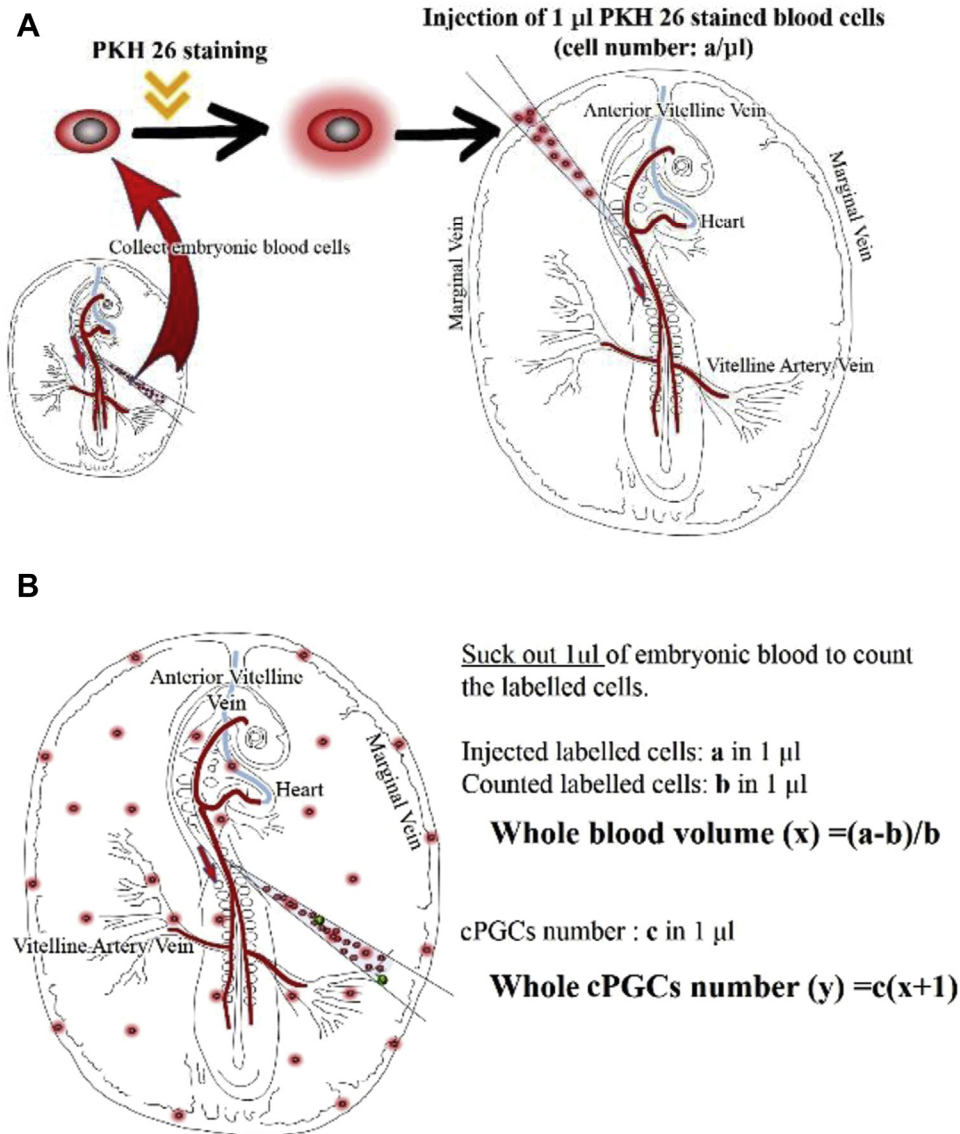


Figure 1. Protocol for the measurement of whole embryonic blood volume and cPGCs number at various developmental stages.

each embryo was obtained by using the formula $(a-b)/b$ (where “a” represents the number of labeled cells injected in 1 μ L of cell suspension, and “b” represents the number of labeled cells counted in 1 μ L of drawn blood sample).

All the PKH26-positive cells in the embryonic blood samples were counted under a fluorescent inverted microscope (Axiovert 40 VFL; Zeiss, Germany).

Measurement of Number of cPGCs Through Stages 13 to 16

For the measurement of the number of cPGCs, the embryonic blood samples collected from stages 13 to 16 HH were prepared by following the same protocol as described for the measurement of embryonic blood volume. After incubation for 10 min at 38°C after the injection of labeled cells, 1 μ L of embryonic blood was drawn out to count the number of cPGCs and PKH26-positive blood cells in each developmental stage (sample number

at stages 13, 14, 15, and 16 HH were found to be 12, 15, 17, and 20, respectively).

The cPGCs were counted under an inverted phase-contrast microscope (Axiovert 40 VFL; Zeiss, Germany). The cPGCs can be easily identified by their large size (12–16 μ m in diameter), compared to embryonic blood cells (around 8 μ m in diameter) at the same developmental stage, cytoplasm rich in yolk granules, and presence of spherical large-sized nuclei.

The total number of cPGCs in each developmental stage was obtained by using the formula $c(x + 1)$ (where c represents the number of cPGCs counted per 1 μ L of blood, and x is the calculated whole embryonic blood volume).

RESULTS

The total volume of embryonic blood was calculated based on the number of PKH26-positive cells at each evaluated stage of embryogenesis, and the total number

of cPGCs in 1 μL of embryonic blood at each developmental stage was also calculated based on the results obtained for embryonic blood volume.

Blood Volume and Number of PGCs Through Stages 13 to 16 HH

Embryonic blood volume of GP chicks was measured at stages 13 to 16 HH, and the changes observed in the whole embryonic blood volume over time are shown in Figure 2. The mean blood volumes were found to be 8.1, 20.8, 11.4, and 17.5 μL at stages 13, 14, 15, and 16 HH, respectively.

The number of PGCs in 1 μL of embryonic blood (concentration of cPGCs) was determined at stages 13 to 16 HH. As shown in Figure 3, the peak concentration of cPGCs per 1 μL of embryonic blood was observed at stage 14 HH (18.6 PGCs/ μL).

The total number of cPGCs in the embryonic blood at each embryonic stage was calculated based on the number of PGCs present per μL of sample and calculated total volume of embryonic blood. Figure 4 shows the result of the calculated number of total cPGCs, which were found to be 111.0, 386.3, 145.2, and 131.9 through stages 13 to 16 HH, respectively. The peak number of cPGCs in the whole embryonic bloodstream was obtained at stage 14 HH (386.3 PGCs/ μL).

DISCUSSION

Generally, chicken embryos work as excellent experimental models and yield specific data that are difficult to obtain in other species. In particular, chicken PGCs have significant potential to be used as a model to carry out different studies in vertebrates (Farzaneh et al., 2016; Trefil et al., 2017; Han and Park, 2018). According to Al-Thani and Simkiss (1991), when the fertilized eggs of Rhode Island Red chickens were incubated at 37.5°C, peak concentration of the cPGCs in the embryonic blood was observed at stage 16 HH. Comparison of the number of cPGCs at different temperatures (36°C and 38°C) showed that the peak flux occurred at stage 15 HH of development at 36°C, which indicates an early developmental stage, whereas the peak was observed at stage 16

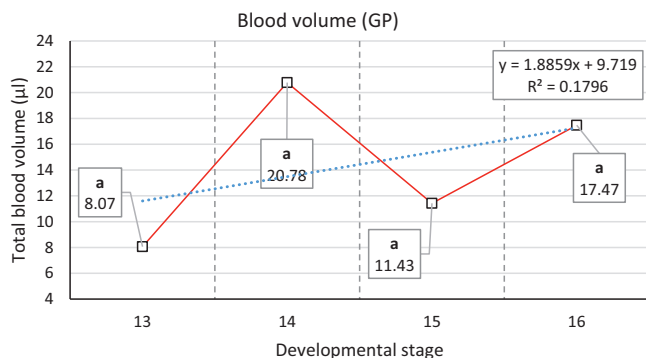


Figure 2. Changes of embryonic blood volume in Green-legged Partridge-like chicken

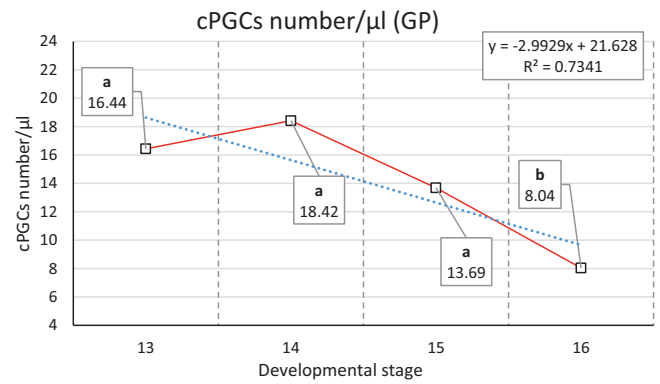


Figure 3. cPGCs number in 1 μL of embryonic blood.

HH when the embryos were incubated at 38°C. However, Tajima et al. (1999) reported that the concentration of cPGCs in White Rock chickens was found to be the highest at stage 14 HH and decreased thereafter. Zhao et al. (2003) reported in inbred stock of Rhode Island Red chickens that 3 variation patterns, for number of cPGCs per 1 μL of sample, could be determined in different individuals at 38°C, with peaks at stages 13, 14, and 15 HH, respectively, and not at stage 16 HH. According to de Melo Bernardo et al. (2012), the migration of PGCs from the germinal crescent region into the embryonic bloodstream occurs continuously from stages 11 HH to 16 HH, and the major peak is observed from stages 12 HH to 13 HH.

Most of the previous studies used common chicken breeds, for example, Rhode Island Red (Al-Thani and Simkiss, 1991, 1992; Zhao et al., 2003), White Leghorn (de Melo Bernardo et al., 2012), White Rock (Tajima et al., 1999), and so on. However, in the case of inbred lines or endangered breeds, the number of total PGCs seems to be lower than that observed for commercial chicken breeds.

In the present study, the peak concentration of cPGCs of GP was found to be 18.6/ μL , which is less than the peak concentrations of both noninbred line (66.9/ μL at stage 14 HH; Tajima et al., 1999) and inbred line (26.8/ μL at stage 14 HH; Zhao et al., 2003). In contrast, a threatened indigenous fowl (Kureko Dori) found in Japan has only 12.1 cPGCs/ μL at stage 14 HH

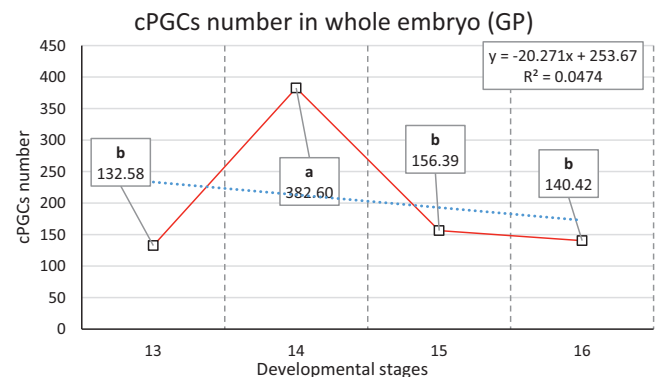


Figure 4. cPGCs number in whole embryo.

(Kuwana et al., 2006). Kuwana et al. (2006) suggested a big variation in the PGC concentration even within the same breed, and this might be the topic of research in future.

However, it should be noted that in the present study, the concentrations of cPGCs were directly measured. The total volumes of embryonic blood were calculated based on the concentrations of PKH26-stained embryonic blood cells which were injected 10 min before the blood sampling procedure in the same embryos through stages 13 to 16 HH in GP chickens, and both peak concentration and peak total number of cPGCs were observed at the same stage of development (stage 14 HH). The total number of cPGCs in the whole embryo is determined from the concentration of cPGCs and the blood volume. Thus, for manipulating the PGCs of GP chickens, it is recommended that they be collected from the embryos that are in stage 14 HH of development, and the number of cells estimated to be present at this stage is about 380. Then, there was a decrease in concentration, suggesting that the circulating PGCs might be trapped gradually by the capillary networks at the future gonadal regions after stage 15 HH. This finding is confirmed by our earlier study (Szczerba et al., 2019), which revealed that the blood flow in the future gonadal regions does not develop until the end of stage 14 HH because there is no functional outflow vein. In the early half of stage 15 HH, posterior vitelline vein rapidly develops on the left side of the gonadal region, and the vascular system at the gonadal regions receives its outflow vein. The present study might be the first report to measure, by the direct method, based on the concentrations of PKH26-stained embryonic blood cells, the total number of cPGCs throughout the circulating phase of PGCs in domestic endangered chicken breed.

ACKNOWLEDGMENTS

The work reported herein was supported by the National Science Centre, grant no. UMO-2017/27/B/NZ9/01510.

DISCLOSURES

The authors did not provide a conflict of interest statement.

REFERENCES

- Al-Thani, R., and K. Simkiss. 1991. Effects of an acute in vivo application of concanavalin A on the migration of avian primordial germ cells. *Protoplasma* 161:52–57.
- Al-Thani, R., and K. Simkiss. 1992. Effects of temperature on the migration of primordial germ cells in the chick embryo. *Br. Poult. Sci.* 33:735–739.
- Bednarczyk, M., P. Łakota, R. Słomski, A. Pławski, D. Lipiński, B. Siemieniako, M. Lisowski, P. Czekalski, B. Grajewski, and P. Dłużniewska. 2002. Reconstitution of a chicken breed by inter Se mating of germline Chimeric birds. *Poult. Sci.* 81:1347–1353.
- Bednarczyk, M., I. Kozłowska, P. Łakota, A. Szczerba, K. Stadnicka, and T. Kuwana T. 2018. Generation of transgenic chickens by the non-viral, cell-based method: effectiveness of some elements of this strategy. *J. Appl. Genet.* 59:81–89.
- Chojnacka-Puchta, L., K. Kasperczyk, G. Płucienniczak, D. Sawicka, and M. Bednarczyk. 2012. Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. *Pol. J. Vet. Sci.* 15:181–188.
- Cywa-Benko, K. 2002. Charakterystyka genetyczna i fenotypowa rodzimych rodów kur objętych programem ochrony bioróżnorodności. *Rocz. Nauk. Zootech. Rozprawy Habilitacyjne.* 15:1–112.
- de Melo Bernardo, A., K. Sprenkels, G. Rodrigues, T. Noce, and S. M. Chuva De SousaLopes. 2012. Chicken primordial germ cells use the anterior vitelline veins to enter the embryonic circulation. *Biol. Open* 1:1146–1152.
- Farzaneh, M., S. Khoshnam, and M. Nakhbatolfoghahai. 2016. First scientific record of two cases of partial twinning in the chick embryo, *Gallus gallus domesticus*. *Vet. Rec. Case Rep.* 4:e000353.
- Ginsburg, M., and H. Eyal-Giladi. 1986. Temporal and spatial aspects of the gradual migration of primordial germ cells from the epiblast into the germinal crescent in the avian embryo. *Development* 95:53–71.
- Glover, J. D., and M. J. McGrew. 2012. Primordial germ cell technologies for avian germplasm cryopreservation and investigating germ cell development. *J. Poult. Sci.* 49:155–162.
- Hamburger, V., and H. L. Hamilton. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* 88:49–92.
- Han, J. Y., and Y. H. Park. 2018. Primordial germ cell-mediated transgenesis and genome editing in birds. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 9:19.
- Kostaman, T., T. L. Yusuf, M. Fahrudin, and M. A. Setiadi. 2013. Isolation and number of circulated primordial germ cells (circulated-PGCs) on stages of embryonic development of Gaok chicken. *JITV* 18:27–33.
- Kuwana, T. 1993. Migration of avian primordial germ cells toward the gonadal anlage. *Dev. Growth Differ.* 35:237–243.
- Kuwana, T., T. Kawashima, M. Naito, H. Yamashita, M. Matsuzaki, and T. Takano. 2006. Conservation of a threatened indigenous fowl (Kureko Dori) using the germline Chimeras Transplanted from primordial germ cells. *J. Poult. Sci.* 43:60–66.
- Sawicka, D., J. Brzezińska, and M. Bednarczyk. 2011. Cryoconservation of embryonic cells and gametes as a poultry biodiversity preservation method. *Folia Biol.* 59:1–5.
- Sawicka, D., L. Chojnacka-Puchta, M. Zieliński, G. Płucienniczak, A. Płucienniczak, and M. Bednarczyk. 2015. Flow cytometric analysis of apoptosis in cryoconserved chicken primordial germ cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 20:143–159.
- Siwek, M., A. Sławińska, P. Łakota, B. Grajewski, M. Wawrzyńska, E. Wiśniewska, A. Pławski, R. Słomski, and M. Bednarczyk. 2010. Identification of the rate of Chimerism of different Tissues with Microsatellite Markers in chicken Chimeras. *Fol. Biol.* 58:257–263.
- Siwek, M., J. Szyda, A. Sławińska, and M. Bednarczyk. 2012. Detection of two QTL on chicken chromosome 14 for keyhole lymphocyte cyanin. *J. Appl. Genet.* 53:115–119.
- Siwek, M., D. Wragg, A. Sławińska, M. Malek, O. Hanotte, and M. Mwacharo. 2013. Insights into the genetic history of Green-legged Partridge-like fowl: mtDNA and genome-wide SNP analysis. *Anim. Genet.* 44:522–532.
- Sławińska, A., A. Witkowski, M. Nieuwland, G. Minozzi, M. Bednarczyk, and M. Siwek. 2011. Quantitative trait loci associated with the humoral innate immune response in chickens were confirmed in a cross between Green-Legged Partridge-like and White Leghorn. *Poult. Sci.* 90:1909–1915.
- Sławińska, A., M. Siwek, and M. Bednarczyk. 2014. Effects of synbiotics injected in ovo on regulation of immune-related gene expression in adult chickens. *Am. J. Vet. Res.* 75:997–1003.
- Swift, C. H. 1914. Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *Am. J. Anat.* 15:483–516.
- Szczerba, A., T. Kuwana, and M. Bednarczyk. 2019. The developmental changes in the extra-embryonic vascular system in the

- circulating phase of primordial germ cells in Aves. *Fol. Biol. (Kraków)* 67:79–83.
- Tajima, A., H. Hayashi, A. Kamizumi, J. Ogura, T. Kuwana, and T. Chikamune. 1999. Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *J. Exp. Zool* 284:759–764.
- Trefil, P., D. Aumann, A. Koslova, J. Mucksova, B. Benesova, J. Kalina, C. Wurmsel, R. Fries, D. Elleder, B. Schusser, and J. Hejnar. 2017. Male fertility restored by transplanting primordial germ cells into testes: a new way towards efficient transgenesis in chicken. *Sci. Rep.* 7:14246.
- Witkowski, A., K. Kasperczyk, A. Sławińska, and M. Bednarczyk. 2009. The breed of the month: green-legged Partridge-like. An old, native, Polish hen. *Glob. Div. Newsl.* 9:12–15.
- Xie, L., Z. Lu, D. Chen, M. Yang, Y. Liao, W. Mao, L. Mo, J. Sun, W. Yang, H. Xu, K. Lu, and Y. Lu. 2019. Derivation of chicken primordial germ cells using an indirect Co-culture system. *Theriogenology* 123:83–89.
- Zhao, D. F., H. Yamashita, M. Matsuzaki, T. Takao, S.-H. Abe, M. Naito, and T. Kuwana. 2003. Genetic factors affect the number of circulating primordial germ cells in early chick embryos. *J. Poultry Sci.* 40:101–113.

Article

In Vitro Culture of Chicken Circulating and Gonadal Primordial Germ Cells on a Somatic Feeder Layer of Avian Origin

Agata Szczerba *, Takashi Kuwana, Michelle Paradowska and Marek Bednarczyk

Department of Animal Biotechnology and Genetics, Faculty of Animal Breeding and Biology, UTP University of Science and Technology, Mazowiecka 28, 85-084 Bydgoszcz, Poland; kuwanat@gmail.com (T.K.); michelle.paradowska@utp.edu.pl (M.P.); marbed13@op.pl (M.B.)

* Correspondence: agata.szczerba@utp.edu.pl

Received: 7 September 2020; Accepted: 28 September 2020; Published: 30 September 2020



Simple Summary: Chicken primordial germ cells are specialized cells that are formed outside the developing embryo, from where they migrate into the gonad, and give rise to the gametes. There are two types of those cells: Circulating blood primordial germ cells and gonadal primordial germ cells. They can be isolated only in low numbers from the bloodstream or gonads of donor embryos. Hence, efficient in vitro cultivation systems are required to increase their quantity through proliferation. Here, we provide a single culture system that can be used to cultivate both cell types. We also present a novel, easy-to-train, and non-invasive method to identify live primordial germ cells in the culture. In this analysis, chicken primordial germ cells obtained from embryonic blood or gonadal regions were cultured in vitro on feeder cell layers derived from embryonic chick cells. The use of the chicken origin feeder layer allowed reducing the xenogenic animal factors in the culture. We demonstrated a feasible and cost-efficient technique to routinely assess the cultivated primordial germ cells on the basis of their morphological characteristics and using the optical features of cells in darkfield illumination. This method is especially useful to distinguish primordial germ cells during co-cultivation with other cell types.

Abstract: The present study had two aims: (1) To develop a culture system that imitates a normal physiological environment of primordial germ cells (PGCs). There are two types of PGCs in chicken: Circulating blood (cPGCs) and gonadal (gPGCs). The culture condition must support the proliferation of both cPGCs and gPGCs, without affecting their migratory properties and must be deprived of xenobiotic factors, and (2) to propose an easy-to-train, nonlabeling optical technique for the routine identification of live PGCs. To address the first aim, early chicken embryo's feeder cells were examined instead of using feeder cells from mammalian species. The KAv-1 medium at pH 8.0 with the addition of bFGF (basic fibroblast growth factor) was used instead of a conventional culture medium (pH approximately 7.2). Both cPGCs and gPGCs proliferated in vitro and retained their migratory ability after 2 weeks of culture. The cultivated cPGCs and gPGCs colonized the right and/or left gonads of the recipient male and female embryos. To address the second aim, we demonstrated a simple and rapid method to identify live PGCs as bright cells under darkfield illumination. The PGCs rich in lipid droplets in their cytoplasm highly contrasted with the co-cultured feeder layer and other cell populations in the culture.

Keywords: primordial germ cells; gPGCs; cPGCs; chicken; embryo; feeder cell layer

1. Introduction

An efficient *in vitro* system for the cultivation of avian primordial germ cells (PGCs) is required for routine implementation of PGC-based programs to conserve endangered species [1–4] as well as for genome editing [5] and transgenic animal technologies [6].

PGCs are the only cells in developing embryos that have the potential to transmit genetic information to the next generations. This potential exists even when PGCs are isolated from donors, manipulated *in vitro*, and reintroduced into recipient embryos [7]. However, several factors limit the use of avian PGCs on a wide scale. One of the most problematic technical issues is the limited number of PGCs that can be obtained from a single embryo [8,9]. Although PGCs can be sourced either from blood as circulating PGCs (cPGCs) or from gonads (gPGCs) at certain embryonic stages, the recoverable cell population number is low and different, for both types of PGCs contain lipid droplets and accumulated glycogen. Both cPGCs and gPGCs stain with anti-SSEA-1, anti-EMA-1, anti-CVH, anti-integrin β 1, and anti-CEACAM antibodies [10,11].

To enable the biotechnological use of a limited number of isolated PGCs, it is important to increase their populations by *in vitro* propagation. Park and Han [12] were the first who documented the effective long-term culture of gonadal PGCs. The cells were isolated on day 5.5 of embryo incubation (at the 28 stage Hamburger and Hamilton (H&H) of development) [13] and cultured with SCF (stem cell factor), LIF (leukemia inhibitory factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), IL-11 (interleukin 11), and IGF-1 (insulin-like growth factor 1) on the chick embryonic fibroblast layer at pH 7.2. Naito [14] also used a feeder cell layer to propagate the growth of cPGCs obtained from chick circulating blood. The long-term culture of cPGCs was also performed by Van De Lavoie et al. [15], with the addition of FGF and SCF to a conditioned medium. These cPGCs were cultivated on STO (mouse, Sandos inbred mouse (SIM)-derived 6-thioguanine- and ouabain-resistant) or BRL (buffalo rat liver) feeder cells. Nevertheless, the propagation of female PGCs in their system was less effective than that of male PGCs [15,16]. Similarly, in the method of Tonus et al. [17], all the resulting PGC lines tended to be devoid of female PGCs.

cPGCs can be collected from the embryo bloodstream during H&H stages 13 to 16 and placed into culture plates as “whole blood” isolates. One of the arguments for the use of gPGCs is their relatively higher number that can be extracted from gonadal ridges [18]. Moreover, less operator skills are needed to isolate gonads than to manipulate blood arteries in the embryos. Yet, it cannot be definitely determined which PGC type should be preferred over another to successfully achieve various technological goals. Kim and Han [19] emphasize a need to gain a deeper knowledge of epigenetic mechanisms, which might be affected not only by the culture conditions but also by somatic factors of recipient surrogates. Marker-assisted sorting techniques have been developed to fractionate PGCs from the isolated cell cohorts and can be used for both gPGCs and cPGCs [20].

Here, we provide a single culture system that can be used to cultivate both cell types—gPGCs and cPGCs. We assumed that the culture condition based on a feeder layer of avian origin and medium optimized to pH 8.0 would imitate the natural environment of PGCs and thus support their proliferation and migration. We also present a novel, easy-to-train, and noninvasive method to identify live PGCs in the culture.

2. Materials and Methods

2.1. Fertilized Eggs and Incubation

In every planned experiment, 30 fertilized eggs from the Ross 308 crossbred chicken were purchased from Drobex-Agro Sp. Zoo. (Solec Kujawski, Poland). Eggs were incubated at 38 °C and 65% relative humidity for 72 h to obtain gPGCs and fibroblasts for the feeder layer. Both types of cells were obtained from embryos at 18 stage of H&H. Fertilized eggs were also incubated at 38 °C and 65% relative humidity for 53 h to reach H&H stages 14–15 to obtain cPGCs.

All experimental procedures were conducted according to the guidelines for the care and use of experimental animals of University of Science and Technology. The experimental protocols were approved by the Local Ethical Committee for Animal Experiments in Bydgoszcz.

2.2. Preparation of Feeder Cells

A feeder layer for cultivating chicken PGCs was used in the present analysis. Cells from the chick embryos were collected to obtain the feeder layer. The posterior region of the vitellin artery of the embryos was cut with micro-scissors. The artery was then washed twice with phosphate-buffered saline (PBS, SH30256.02, HyClone™, Logan, UT, USA). The excised tissues were rinsed with Ca²⁺- and Mg²⁺-free PBS (PBS(-); 52321C, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and submerged into 150 µL of 0.1% Trypsin-0.02% EDTA in PBS(-) in a plastic Petri dish (93060, TPP, Switzerland) at room temperature. After 20 min, 150 µL of KAv-1 medium [21] was added to disperse the tissue and obtain a cell suspension. Next, it was transferred to a 1.5 mL Eppendorf tube and filled to a volume of 1 mL with KAv-1 medium. The suspension was centrifuged at 400× g for 5 min, and the supernatant was removed. The remaining pellet was suspended in 2 mL KAv-1 medium and transferred into a well of a 48-well plate (Costar 3526, Corning Inc., New York, NY, USA). The well was coated earlier with collagen from rat tail and secured with a sealing film (Platamax® AxySeal Sealing Film, PCR-SP, Axygen Inc., Union City, CA, USA). The cells were incubated at 37.8 °C. The medium change was performed every 2 to 3 days.

In the next step, cultured feeder cells were treated with 10 µg/mL mitomycin C (MMC) in KAv-1 medium at 38 °C and washed two times with fresh KAv-1 medium after 2 to 3 h. The cells were also treated with 0.1% Trypsin-0.02% EDTA in PBS(-) for 8 min at 38 °C. Next, the cells were suspended in the solution with the same volume of fresh KAv-1 medium. The obtained cell suspension was centrifuged at 800× g for 3 min at room temperature. The supernatant was removed, and the pellet was suspended in the fresh KAv-1 medium. The cells were cultured in a plastic flask (12.5 cm², 353018, Falcon, Corning, New York, NY, USA) with 10 µM/mL Y-27632 (SCM075, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) until use.

2.3. Chick Embryo Extracts

Fertilized eggs from chicken breed Ross 308 were incubated for 5 days. The chick embryos were isolated from the yolk and washed with physiological saline. Each embryo was homogenized with the 800 µL KAv-1 medium. The received suspension was centrifuged for 30 min at room temperature. The supernatant was collected for further use. The obtained chick embryo extract (CEE) was filtered with a 0.45-µm pore size membrane filter (99745, TPP, Trasadingen, Switzerland) and stocked at −20 °C until use.

2.4. Preparation of Rat Tail Collagen

A rat tail was used to obtain collagen. The adult rat tail was washed two times with PBS, and the skin from the tail was removed. The tail was then cut into 1-cm sections with clean scissors. By using forceps, the tendon fibers were detached and collected in fresh PBS. The collected fibers were washed with pure water (03-055-1A, BI, Beit-Haemek, Israel) and sterilized by soaking in 70% ethanol for 20 min. They were also submerged in 99.6% ethanol for 10 min and then washed twice with sterile pure water. Finally, the tendon fibers were immersed in a solution of 0.1% acetic acid in pure water for 1 week at 4 °C. Following this, the supernatant was used to coat the bottom of the wells of multi-well plates.

2.5. Culture of PGCs

2.5.1. Culture Medium

In the present study, a basic KAv-1 medium containing 5% fetal bovine serum (F2442-100ML, Sigma-Aldrich) and 5% chicken serum (C5405-500ML, Sigma-Aldrich) was used as a standard medium. This medium was adjusted to pH 8.0 [21]. The modified KAv-1 medium (mKAv-1) was also used,

which contained 5% Knock Out Serum Replacement (KO-SR; 10828028, Gibco by Life Technologies, Waltham, MA, USA), 10 ng/mL b-FGF (F0291-25UG, Sigma-Aldrich), and 20 μ L/mL of the earlier obtained CEE.

2.5.2. Culture of gPGCs

The gPGCs were obtained from embryos at stages 17 to 18 H&H. The embryos ($n = 15$ per experiment) were washed with physiological saline. Next, the gonadal regions were excised using micro-scissors. The gonadal region at H&H stages 17 to 18 comprises the posterior embryonic body region of vitelline arteries. The tissues were collected in an Eppendorf tube and washed with physiological saline to remove yolk granules. They were then treated with 500 μ L of PBS(-) for 3 min at room temperature and centrifuged at $800\times g$ for 2 min. The supernatant was then removed. The remaining tissues were soaked in 500 μ L of 0.1% Trypsin–0.02% EDTA in PBS(-) and incubated at 38 °C. After 8 min, 500 μ L of KAv-1 medium was added to the tube, and the tissues were gently dispersed. The suspension was then centrifuged at $800\times g$ for 2 min. The supernatant was removed, and the remaining cells were dispersed. Finally, the cells were seeded into a 12.5 cm² culture flask (Falcon, Corning, New York, NY, USA) with 3 mL of modified KAv-1 medium. The cells obtained from the gonadal regions were cultured at 38 °C. Half of the medium was replaced with a fresh medium every 2 days.

The gPGCs were subcultured when they completely covered the surface of the culture flask, usually after 3 days of culture and every 3 days thereafter. The proliferated gPGCs were collected using 0.02% EDTA in PBS(-), which was gently pipetted on the cells. To collect gPGCs that were loosely attached to the somatic cells, the culture flask was rinsed twice with 2 mL of PBS(-). The obtained solution of gPGCs was stocked in a 15-mL plastic centrifuge tube (Corning, USA). The remaining gPGCs in the flask were additionally treated with 2 mL of 0.02% EDTA in PBS(-) for 10 min at room temperature. The solution with remaining clusters of gPGCs was collected into the same 15 mL plastic centrifuge tube as described previously. The next step was centrifugation at $800\times g$ for 3 min. The cell pellet was suspended in 1 mL of 0.1% Trypsin–0.02% EDTA PBS(-) and kept at 38 °C. After 6 min, 1 mL of fresh KAv-1 medium was added and suspended to obtain a single cell suspension. The cells were centrifuged once again in $800\times g$ for 3 min at room temperature and then seeded on MMC (MMC; M4287-2MG, Sigma-Aldrich)-treated feeder cells.

2.5.3. Culture of cPGCs

To obtain cPGCs, the first step was to extract embryonic blood from 10 embryos at embryonic stages 14 to 15 H&H. The blood was withdrawn using a fine glass micropipette and pooled in a 1.5-mL Eppendorf tube with 500 μ L KAv-1 medium. The blood was then centrifuged at $800\times g$ for 3 min at room temperature. The collected cells were labeled with the fluorescent dye PKH26-GF (Z-PKH26-GF, Zynaxis, Malvern, PA, USA) according to the manufacturer's instructions. Next, the cells were washed twice with fresh KAv-1 medium and seeded on a chicken feeder cell layer. When the cPGCs started to proliferate in a primary culture, they were passaged (as described for gPGCs in Section 2.5.2) and continuously co-cultured on the feeder cells.

2.6. Migratory Abilities of Cultured PGCs to the Recipient Gonads

To determine the migratory ability of pre-cultivated gPGCs and cPGCs, the cells were detached from the feeder layer by using PBS(-) to rinse the cells, followed by treatment with 0.02% EDTA in PBS(-) for 5 min at room temperature. The dispersed cells were labeled with the fluorescent dye PKH26-GF according to the manufacturer's instructions. Next, 500–800 labeled cells were injected into each embryo's bloodstream at H&H stages 14 to 16. The cells were injected through a 5 to 10 mm window in the eggshell of the recipients. The windows in the eggshell were sealed with an adhesion tape (#800, Scotch, St. Paul, MN, USA) and additionally sealed on the edges with glue (E301, Elmer's School Glue, Westerville, OH, USA) to avoid detachment of the tape. The recipient eggs were further incubated at

38 °C for 5 to 6 days. To check the presence of PGCs, the recipient embryos were removed from the eggs and washed with PBS. The gonads were removed from the embryos in PBS. The presence of the labeled cells in the gonads was verified using a fluorescent microscope (DMI8, Leica, Wetzlar, Germany).

3. Results

3.1. Identification of Fresh and Cultured PGCs

In this study, we present a new criterion to identify PGCs. We used darkfield illumination as shown in Figure 1. PGCs can be easily identified from lipid compounds and deposits in their cytoplasm. PGCs are distinguished as bright cells contrasting with the surrounding cells.

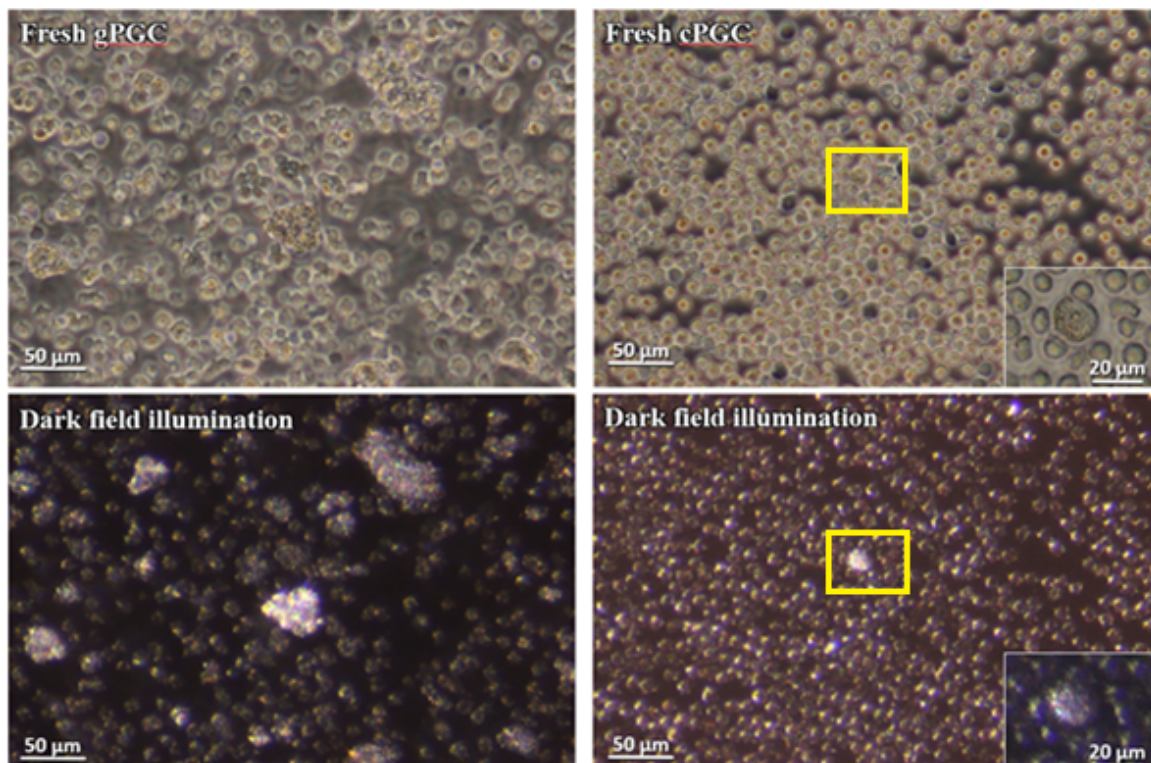


Figure 1. Fresh gonadal primordial germ cells (gPGCs) and circulating blood primordial germ cells (cPGCs) observed under an inverted phase-contrast microscope; gPGCs and cPGCs are visualized in darkfield illumination. The PGCs are distinguished as bright, illuminated cells among other cell types (P.434242 patent application number). Magnification with 40× objective (Leica DMI8, Germany).

3.2. Culture of PGCs

3.2.1. Culture of PGCs Collected at Stage 18 H&H

The gPGCs were subcultured every 4 to 5 days. The morphological features after 1 and 2 weeks of culture showed the same characteristics as those of the freshly isolated PGCs (Figure 2a,b; upper images). The cells proliferated and formed small clusters on the somatic feeder cell layer. In the present study, their doubling time was approximately 84 h gPGCs that could be easily identified as bright cells in darkfield illumination at all times (Figure 2a,b; lower images).

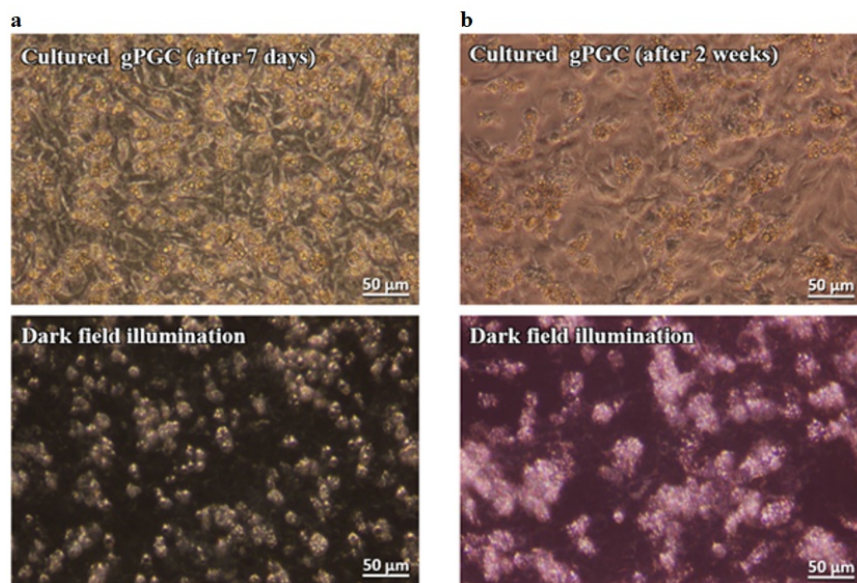


Figure 2. The gPGCs cultured for 7 and 14 days, observed under an inverted phase-contrast microscope and in darkfield illumination. This technique allows us to clearly distinguish PGCs from the feeder layer and other cells. The PGCs are visible as bright, illuminated cells among the other cell types (P.434242 patent application number). Magnification with 40× objective (Leica DMI8).

3.2.2. Culture of cPGCs at Stages 14 to 15 H&H

The medium change must be performed on the following day after seeding cPGCs on the feeder cell layer to reduce the number of embryonic blood cells that did not adhere to the feeder layer. Consecutive medium changes were performed every 2 days. After the 4th medium change (7th day of incubation), clusters of proliferated cPGCs were observed (Figure 3). Only a few remaining embryonic blood cells were found. Small clusters of cPGCs were observed by PKH26 staining. These cells had the same morphological features as the bright cells observed under darkfield illumination (Figure 3).

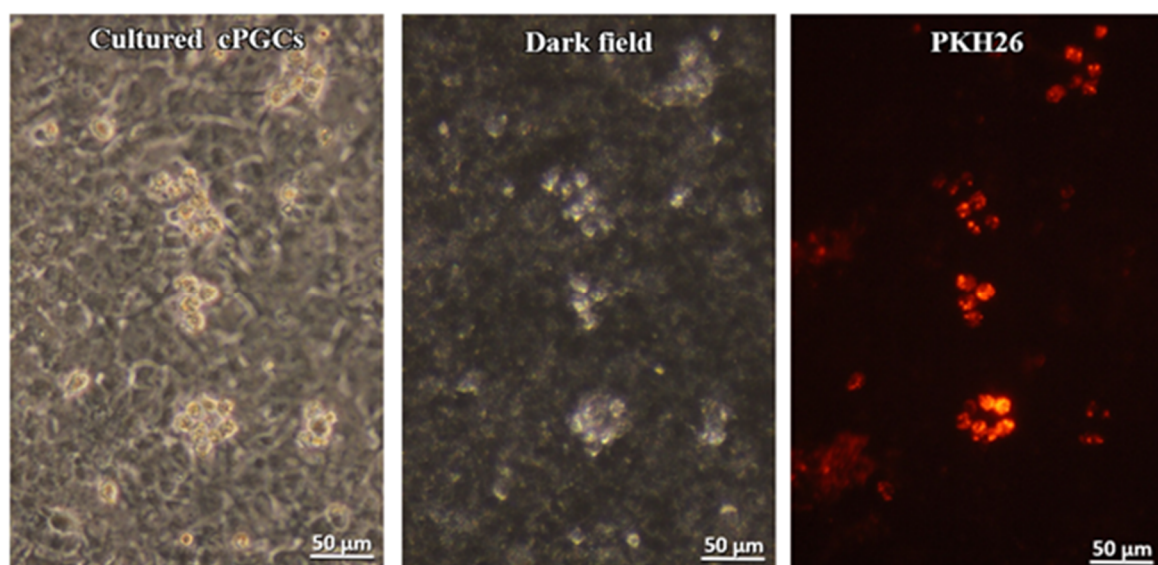


Figure 3. The cPGCs cultured for 7 days observed under an inverted phase-contrast microscope and darkfield illumination (P.434242 patent application number). The cells were stained after 7 days of culture using PKH26 fluorescent dye. Magnification of the objective 40× (Leica DMI8).

3.3. Migratory Ability of Cultured PGCs to the Recipient Gonads

Both types of cells—gPGCs and cPGCs were cultured and then injected into the bloodstream of the recipient embryos at H&H stages 13 to 16. This was performed to confirm whether the pre-cultivated PGCs retained their ability to migrate into the recipient embryonic gonads.

3.3.1. Cultured gPGCs

After 15 days of culture, the gPGCs were diluted with KAv-1 medium to obtain 800 g PGCs/ μ L, and 3 μ L of this solution was injected into the recipient's peripheral vein at stages 13 to 16 H&H. The embryonated eggs with the injected PGCs were further incubated in the egg incubator at 38 °C. Ten out of 14 recipient (71%) embryos developed normally after 5 or 6 days as shown in Tables 1 and 2. As shown in Table 1, the injected PGCs that were cultured were incorporated into gonads of all survived embryos (after 5 days, $n = 4$; after 6 days, $n = 6$). Most of the injected gPGCs were found in the left gonad and not in the right gonad. Szczerba et al. [22] observed that after the formation of the posterior vitelline vein, the area of blood vessels in the left gonad increases compared to that in the right gonad. This is due to the formation of the posterior vitelline vein only on the left side of the embryo. The bloodstream in the capillary network on the left side can, therefore, flow directly into the vein, while the bloodstream on the right side of the network cannot flow into any other vein. The older the embryo is, the more is the development of the circulatory system, which may be the cause of higher mortality.

Table 1. Colonization of the recipient gonads with the cultivated gPGCs examined after 5 days post injection.

No. of Recipient Embryo (Injected Stages)	Sex	Presence of Injected gPGCs in Gonads	
		Right Gonad	Left Gonad
G-01 (stage 14)	Female	–	+
G-02 (stage 14)	Male	–	+
G-03 (stage 14)	Male	–	+
G-04 (stage 15)	Female	+	+
G-05 (stage 15)	Female	–	+
G-06 (stage 15)	Male	+	+
G-07 (stage 16)	Female	++	+
G-08 (stage 15+)	Dead		
G-09 (stage 16)	Female	+	+
G-10 (stage 15)	Female	+	+
G-11 (stage 15)	Male	+	++
G-12 (stage 16)	Dead		
G-13 (stage 16)	Dead		
G-14 (stage 16)	Dead		

Table legend. G 01–14 = recipient embryos that received gPGCs; '–' no colonization; '+' gonad colonized at the moderate level; '++' highly colonized gonad.

The collected gonads were dispersed by the trypsin treatment to confirm the cytological features of the incorporated labeled cells. As shown in Figure 4, the dispersed PKH26-labeled cells had retained the morphological feature of gPGCs.

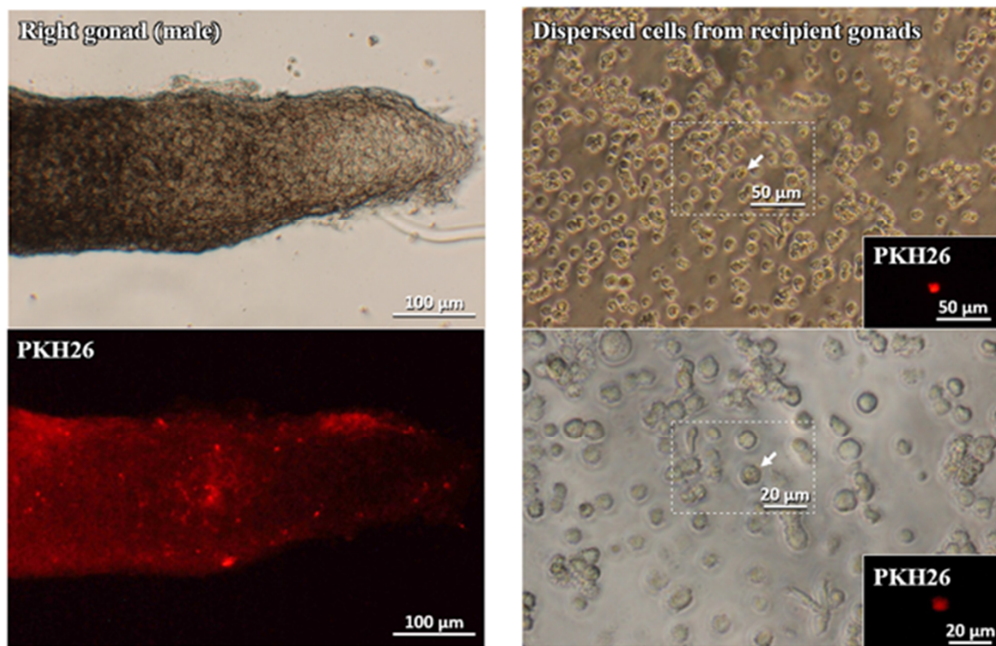


Figure 4. Left panel: Male gonad observed under the microscope (Leica DMI8) and stained with PKH26. Right panel: Dispersed cells from the recipient gonads and stained with PKH26.

The gPGCs were seeded and cultured for at least 7 days. One day after seeding the cells, they were counted manually from many fields of view every day for 7 days by using the Leica DMI8 microscope and darkfield illumination. PGCs were visible as bright cells distinctive from other cell types. This method enabled us to count the cells rapidly and easily without using proliferation assays. Figure 5 shows that the cells proliferated and the fold change increased every day. The gPGCs did not proliferate rapidly because we obtained only three cells from one cell in 7 days.

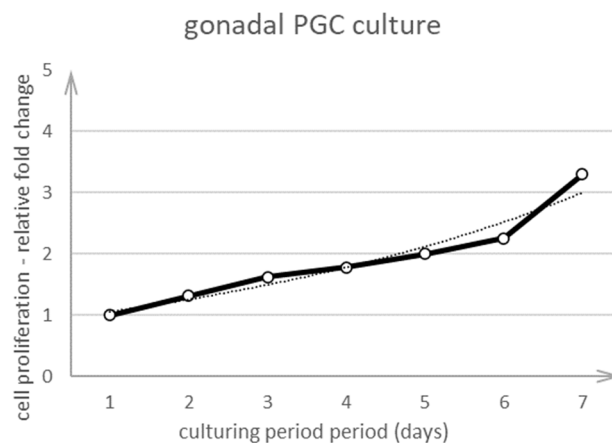


Figure 5. Proliferation curve of gPGCs cultivated on a chicken embryo feeder layer at pH 8.0. The live gPGCs cells were counted directly in the culture by using the darkfield illumination method.

3.3.2. Cultured cPGCs

After 15 days of culture, the cPGCs were diluted with the KAv-1 medium to obtain 800 cPGCs/ μ L, and 3 μ L of this solution was injected into the recipient's peripheral vein at stages 13 to 16 H&H. The embryos with the injected cPGCs were further incubated in the egg incubator at 38 °C. Eleven out of 20 (55%) treated embryos developed normally after 5 days as shown in Table 2. Nine out of these 11 (82%) embryos with injected cPGCs that were incorporated into the gonads survived.

Table 2. The recipient gonads with the cultivated cPGCs examined after 5 days post injection.

No. of Recipient Embryo (Injected Stages)	Sex	Presence of Injected gPGCs in Gonads	
		Right Gonad	Left Gonad
C-01 (stage 14)	Dead		
C-02 (stage 14)	Dead		
C-03 (stage 15)	Dead		
C-04 (stage 15)	Female	+	+
C-05 (stage 13)	Dead		
C-06 (stage 14)	Male	+	++
C-07 (stage 15)	Dead		
C-08 (stage 15)	Dead		
C-09 (stage 14)	Dead		
C-10 (stage 14)	Male	++	+
C-11 (stage 13+)	Female	++	+
C-12 (stage 13)	Male	–	–
C-13 (stage 16)	Male	–	–
C-14 (stage 15)	Female	++	–
C-15 (stage 14)	Male	+	+
C-16 (stage 16)	Male	++	+
C-17 (stage 16+)	Male	++	+
C-18 (stage 15+)	Dead		
C-19 (stage 15)	Dead		
C-20 (stage 16)	Female	+	+

Table legend. C 01–20 = recipient embryos that received cPGCs at the indicated stage 14–16+ H&H; ‘–’ no colonization; ‘+’ gonad colonized at the moderate level; ‘++’ highly colonized gonad.

All the embryonic gonadal tissues were excised with micro-scissors and assessed for the presence of the injected cultured gPGCs in their tissues. The collected gonads were also dispersed using the trypsin treatment to confirm the cytological features of the incorporated labeled cells. The left column of Figure 6 shows the right male gonad under the microscope light and the same gonad using a fluorescent microscope and the dye PKH26.

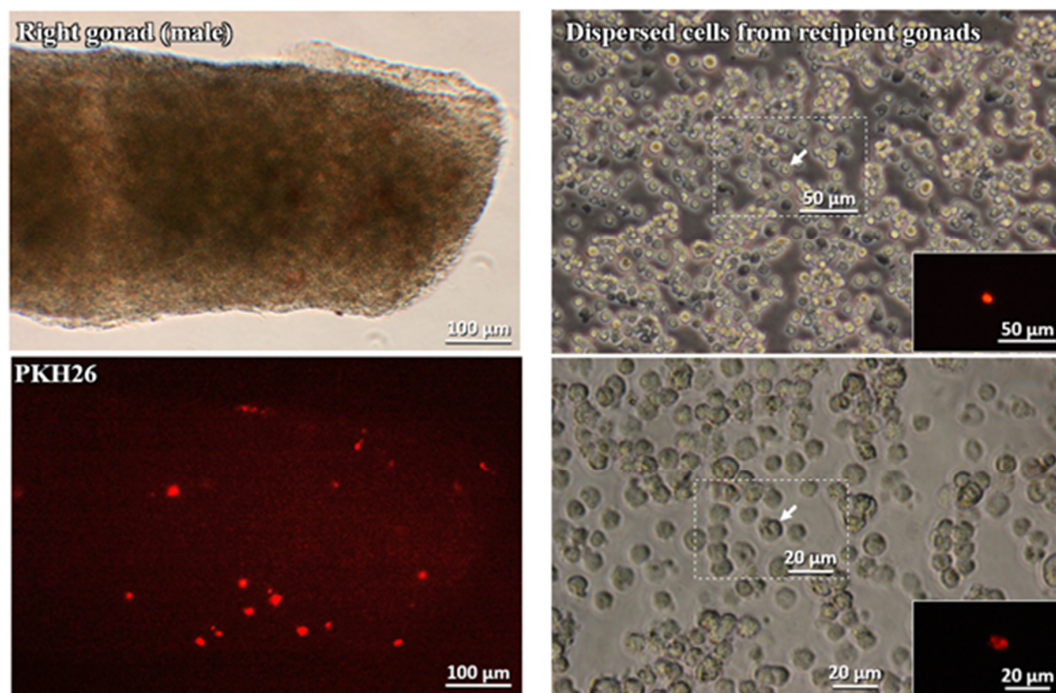


Figure 6. Left panel: The male gonad observed under the microscope (Leica DMI8) and stained with PKH26. Right panel: Dispersed cells from the recipient gonads and stained with PKH26.

The cPGCs were seeded and cultured for at least 7 days. One day after seeding the cells, they were counted manually from many fields of view every day for 7 days using the Leica DMI8 microscope and darkfield illumination. cPGCs were visible as bright cells distinctive from cells of the other types. Figure 7 shows that the cells proliferated and their fold change increased every day. Compared to PGCs obtained from chick embryo gonads, the fold change of cPGCs was higher. Within 7 days, the cells proliferated from one cell to 28 cells.

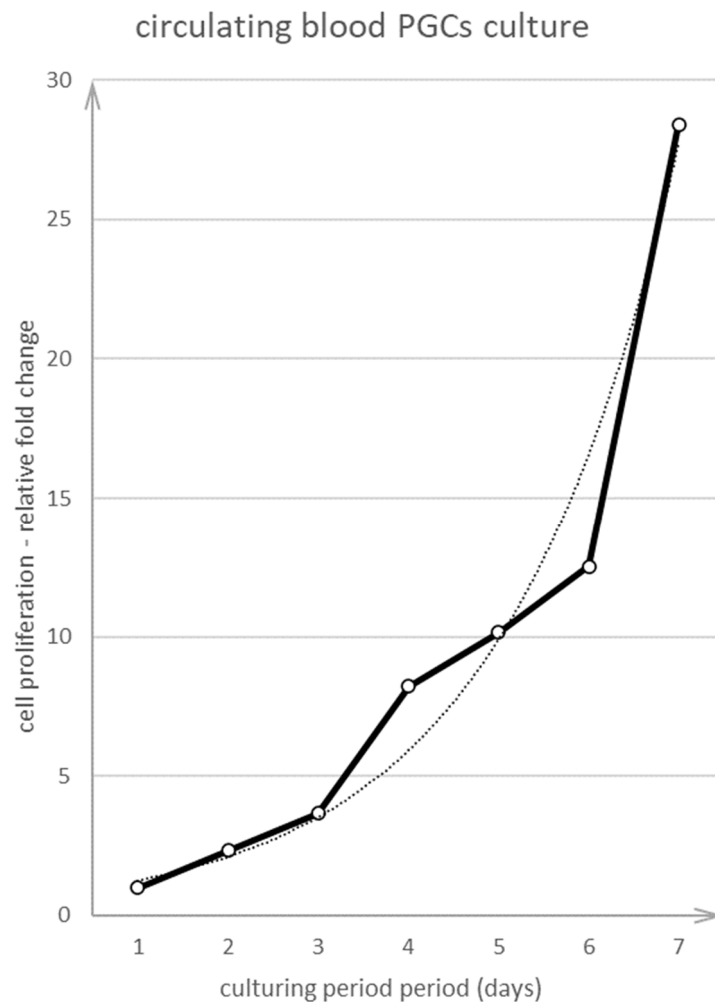


Figure 7. Proliferation curve of cPGCs cultivated on a chicken embryo feeder layer at pH 8.0. The live cPGCs were counted directly in the culture by using the darkfield illumination method.

4. Discussion

Here, a noninvasive and simple method was proposed to distinguish PGCs from other cells in the culture (P.434242 patent application number). The PGCs are characterized by the presence of many lipid droplets in their cytoplasm, a relatively large-sized nucleus, and a spherical shape (Figure 1). Even when using a conventional bright-field light microscope, it may be problematic to identify PGCs in heterogeneous populations, and these cells may be confused with other structures (even with lipid droplets sometimes). The cell structural features generate a specific optical condition that enable their illumination-based identification. Therefore, the rapid method proposed here may increase the efficiency of culture evaluation of PGCs.

In this analysis, chicken PGCs obtained at stages 14 to 15 and 18 H&H from embryonic blood or gonadal regions were cultured in vitro on feeder cell layers derived from embryonic chick cells. The use of the chicken origin feeder layer allowed reducing the xenogenic animal factors in the culture. Here,

in contrary to other studies, the chick PGC culture did not require more commonly used xenogenic feeder cell layers such as mouse (STO), rat (buffalo rat liver [BRL]), or conditioned medium with rat fibroblasts [15,17,23,24]. Here, the conditions were established for maintaining PGCs using the KAv-1 medium at pH 8.0 instead of KO-DMEM at pH 7.2. Chicken serum (CS), KOSR, and bFGF were the other substances used. According to Van De Lavoie et al. [15], CS, SCF, human FGF, and BRL, which produce LIF, may be very important factors in the culture of PGCs. They are known as factors that cause proliferation of the chick PGCs. Woodcock et al. [2] also used a medium containing CS or serum-free medium containing ova transferrin for their research. This allowed minimizing the use of xenobiotics in the culture. Despite the high pH, there were no considerable issues in the growth of PGCs. According to Kuwana et al. [21], the embryonic blood pH in situ between 2 and 11 days of incubation is approximately 8.0. This implies that in such pH, the functioning of chicken PGC is normal; they proliferate and migrate. The outcome of this study indicates that culture conditions such as pH around 8.0 and the presence of an avian fibroblast layer are similar to the environment that occurs naturally in developing chicks. These conditions also have been indicated in other studies [12,25–27].

Several difficulties are encountered while culturing PGCs. The first one is the issue of a very limited number of PGC in situ, which directly poses technical issues to isolate a sufficient founder population. It appears that the most practical method of obtaining PGC is to isolate them from developing gonads of 5- to 7-day-old embryos [18]. This approach allows us to obtain a relatively high amount of viable PGCs in a short time. The disadvantage of this method is the risk of contamination with other types of cells. This shows that no single method is good enough to obtain and cultivate both types of cells. Here, we collected gPGC at H&H stages 17 to 18 from somatic cells of future gonadal regions. The collected gPGCs proliferated and formed clusters on the somatic fibroblast layer. Their morphological features were the same as those of cPGCs in the bloodstream (Figures 1 and 2). The cPGCs had the same morphological characteristics after 7 days of culture, as shown in Figure 3.

The process of collecting and purifying cPGCs from the bloodstream involves several technically demanding steps. This poses a risk of even further loss of cells in the low population of available PGCs. Therefore, we stained the population of bloodstream cells with a fluorescent label immediately after their collection, prior to placing the cells in the culture condition. The characteristic cell behavioural differences allowed distinguishing the somatic blood cells, including erythrocytes, from cPGCs. Many of the seeded cPGCs were loosely connected to the fibroblast cell layer. The embryonic blood cells, however, remained suspended in the medium and did not adhere to the feeder layer. This resulted in blood cells being washed out after several medium changes. As shown in Figure 3, only the clusters of cPGCs remained on the feeder layer. This shows that the cultivation of whole blood cells labeled with PKH26 enabled to “selectively” grow cPGCs on the chicken feeder, without any prior purification step, but with the application of only specific culture conditions. We observed that the morphology was retained upon subculture and culture on the feeder layer. Small clusters were formed which is typical [28]. In the present study, the cultivated gPGCs and cPGCs migrated into the developing gonads of the recipient embryos (Figures 4 and 6, Tables 1 and 2). These results indicate that the pre-cultivated PGCs retained the ability to migrate to the recipient’s gonads as did the native PGCs. The doubling time for PGCs in this analysis was approximately 84 h. Woodcock et al. [2] reported that for cPGCs cultured in vitro, the doubling time was 33.4 h for both sexes. The cell doubling time depends on the genotype and is also affected by the concentration of the initiatory cell population. Different amounts of cells modify the culture conditions in vitro at various rates [28].

Conditions used in this research enabled us to cultivate both types of cells—cPGCs and gPGCs. Very few studies have compared the growth of both types of PGCs in the same culture condition. Recently, only Raucci et al. [11] compared three types of cells in a similar condition: Chicken embryonic stem cells (cES), cPGCs, and gonadal germ cells (GGCs). They used the same embryonic stem avian complete medium with differing FGF concentrations; moreover, an irradiated STO feeder layer was used only for cPGCs. Their conditions enabled a long-term culture of all stem cell types (over 30–40 days)

and did not affect the reactivity to specific markers, but only a higher number of cytoplasmic bridges was observed in the gonadal population [29].

Chicken donor PGCs can be considered functional if, after being subjected to *in vitro* handling involving their cultivation, genetic modifications, and/or conservation protocols, they retain the contribution to germline. In other words, the following criteria should be met in functional PGCs: (1) Ability to colonize recipient gonads and differentiate into gametes, and (2) contribute to the germplasm of the produced chimeras and transmit the genes through generations. Therefore, it is a standard to include a validation task for at least one of the above functions. Here, we showed that both gPGCs and cPGCs that were pre-cultivated in a chicken feeder culture system retained their migratory properties and were incorporated into the recipient gonads. In this study, both gonads of recipient embryos (left and right) were colonized by gPGCs and cPGCs (Tables 1 and 2). One may consider this system to be highly useful, because it allows cultivating both PGC types in the same condition. Naito [30] hypothesized that the population of cPGCs isolated from the embryonic bloodstream is heterogeneous and comprises stem cells with varying potential to differentiate. Therefore, it is expected to have increased differentiation of cPGCs in long-term cultures with loss of stem markers and reduced progenitor potential to form functional gametes. Here, some differences in the distribution of PGCs to the left and right gonads were observed using a subjective scale, e.g., for cPGCs, the right gonad might be considered a more preferred site (++ vs. +, Table 2). However, our results may elicit some contradicting arguments related to the established knowledge of the preferred site for gonadal colonization [22]. Thus, on the basis of our results, we cannot give a clear evidence of whether the sex of the recipient or the location of a gonad (left or right) influenced the fate of migration of the injected PGCs. This must be confirmed using a quantitative experimental design with a larger cohort of pre-cultivated donor PGCs.

5. Conclusions

In the present study, we proposed a method that enabled the cultivation of both cPGCs and gPGCs on the feeder layer of avian origin, with minimum xenobiotic factors. The migratory attraction to the recipient gonads was retained in both cPGCs and gPGCs that were pre-cultivated on the avian feeder layer. We also demonstrated a feasible and cost-efficient technique to routinely assess the cultivated PGCs on the basis of their morphological characteristics and using the optical features of PGCs in darkfield illumination. This method is especially useful to distinguish PGCs in the feeder culture systems or during co-cultivation of PGCs with other cell types. This can be supportive when the other popular protocols such as the MTT metabolic assay (a colorimetric assay for assessing cell metabolic activity) or an automated real-time cell counting system must be excluded due to issues related to the separation of heterogenic cell types in the PGC cultures.

Bearing in mind the mechanisms of epigenetic changes in PGCs [19,31] and factors affecting the molecular stability and fate of cultivated PGCs, further marker-assisted assays will be applied to our *in vitro* systems, followed by *in vivo* validation of the function of retained PGCs.

6. Patents

Patent application number: P.434242.

Author Contributions: Conceptualization, A.S., T.K., and M.B.; methodology, A.S. and T.K.; formal analysis, A.S. and T.K.; investigation, A.S. and T.K.; resources, M.B., data curation, A.S. and T.K.; writing—original draft preparation, A.S., T.K., M.B., and M.P.; writing—review and editing, A.S., T.K., M.B., and M.P.; supervision, M.B.; project administration, M.B.; funding acquisition, M.B. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: The research was supported by grant no. UMO-2017/27/B/NZ9/01510 funded by the Polish National Science Centre.

Acknowledgments: We are grateful to Katarzyna Stadnicka for the interesting discussion about the results obtained in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Sawicka, D.; Chojnacka-Puchta, L.; Zielinski, M.; Plucienniczak, G.; Plucienniczak, A.; Bednarczyk, M. Flow cytometric analysis of apoptosis in cryoconserved chicken primordial germ cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **2015**, *20*, 143–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Woodcock, M.E.; Gheyas, A.A.; Mason, A.S.; Nandi, S.; Taylor, L.; Sherman, A.; Smith, J.; Burt, D.W.; Hawken, R.; McGrew, M.J. Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *116*, 20930–20937. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Mucksová, J.; Reinišová, M.; Kalina, J.; Lejčková, B.; Hejnar, J.; Trefil, P. Conservation of chicken male germline by orthotopic transplantation of primordial germ cells from genetically distant donors. *Biol. Reprod.* **2019**, *101*, 200–207. [[CrossRef](#)]
4. Molnár, M.; Lázár, B.; Sztán, N.; Végi, B.; Drobnýák, Á.; Tóth, R.; Liptói, K.; Marosán, M.; Gócza, E.; Nandi, S.; et al. Investigation of the Guinea fowl and domestic fowl hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 14284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chojnacka-Puchta, L.; Sawicka, D. CRISPR/Cas9 gene editing in a chicken model: Current approaches and applications. *J. Appl. Genet.* **2020**, *61*, 221–229. [[CrossRef](#)]
6. Bednarczyk, M.; Kozłowska, I.; Łakota, P.; Szczerba, A.; Stadnicka, K.; Kuwana, T. Generation of transgenic chickens by the non-viral, cell-based method: Effectiveness of some elements of this strategy. *J. Appl. Genet.* **2018**, *59*, 81–89. [[CrossRef](#)]
7. Kuwana, T. Migration of Avian Primordial Germ Cells toward the Gonadal Anlage. *Dev. Growth Differ.* **1993**, *35*, 237–243. [[CrossRef](#)]
8. Tajima, A.; Hayashi, H.; Kamizumi, A.; Ogura, J.; Kuwana, T.; Chikamune, T. Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *J. Exp. Zool.* **1999**, *284*, 759–764. [[CrossRef](#)]
9. Kuwana, T.; Rogulska, T. Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage. *Cell. Mol. Biol.* **1999**, *45*, 725–736.
10. Motono, M.; Ohashi, T.; Nishijima, K.I.; Iijima, S. Analysis of chicken primordial germ cells. *Cytotechnology* **2008**, *57*, 199–205. [[CrossRef](#)]
11. Raucci, F.; Fuet, A.; Pain, B. In vitro generation and characterization of chicken long-term germ cells from different embryonic origins. *Theriogenology* **2015**, *84*, 732–742.e2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Park, T.S.; Han, J.Y. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol. Reprod. Dev.* **2000**, *56*, 475–482. [[CrossRef](#)]
13. Hamburger, V.; Hamilton, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol.* **1951**, *88*, 49–92. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Naito, M.; Minematsu, T.; Harumi, T.; Kuwana, T. Preferential Migration of Transferred Primordial Germ Cells to Left Germinal Ridge of Recipient Embryos in Chickens. *J. Poult. Sci.* **2009**, *46*, 40–45. [[CrossRef](#)]
15. 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.; et al. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* **2006**, *441*, 766–769. [[CrossRef](#)]
16. Macdonald, J.; Glover, J.D.; Taylor, L.; Sang, H.M.; McGrew, M.J. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15518. [[CrossRef](#)]
17. Tonus, C.; Cloquette, K.; Ectors, F.; Piret, J.; Gillet, L.; Antoine, N.; Desmecht, D.; Vanderplasschen, A.; Waroux, O.; Grobet, L. Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reprod. Fertil. Dev.* **2016**, *28*, 628–639. [[CrossRef](#)]
18. Nakamura, Y.; Kagami, H.; Tagami, T. Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Dev. Growth Differ.* **2013**, *55*, 20–40. [[CrossRef](#)]
19. Kim, Y.M.; Han, J.Y. The early development of germ cells in chicken. *Int. J. Dev. Biol.* **2018**, *62*, 145–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Mozdziaik, P.E.; Angerman-Stewart, J.; Rushton, B.; Pardue, S.L.; Petite, J.N. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult. Sci.* **2005**, *84*, 594–600. [[CrossRef](#)]

21. Kuwana, T.; Hashimoto, K.; Nakanishi, A.; Yasuda, Y.; Tajima, A.; Naito, M. Long-term culture of avian embryonic cells in vitro. *Int. J. Dev. Biol.* **1996**, *40*, 1061–1064. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Szczerba, A.; Kuwana, T.; Bednarczyk, M. The Developmental Changes in the Extra-Embryonic Vascular System in the Circulating Phase of Primordial Germ Cells in Aves. *Folia Biol.* **2019**, *67*, 79–83. [[CrossRef](#)]
23. Oishi, I. Improvement of Transfection Efficiency in Cultured Chicken Primordial Germ Cells by Percoll Density Gradient Centrifugation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2010**, *74*, 2426–2430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Miyahara, D.; Mori, T.; Makino, R.; Nakamura, Y.; Oishi, I.; Ono, T.; Nirasawa, K.; Tagami, T.; Kagami, H. Culture conditions for maintain propagation, long-term survival and germline transmission of chicken primordial germ cell-like cells. *J. Poult. Sci.* **2014**, *51*, 87–95. [[CrossRef](#)]
25. Whyte, J.; Glover, J.D.; Woodcock, M.; Brzeszczynska, J.; Taylor, L.; Sherman, A.; Kaiser, P.; McGrew, M.J. FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Rep.* **2015**, *5*, 1171–1182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Choi, J.W.; Kim, S.; Kim, T.M.; Kim, Y.M.; Seo, H.W.; Park, T.S.; Jeong, J.W.; Song, G.; Han, J.Y. Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e12968. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Guan, W.; Wang, Y.; Hou, L.; Chen, L.; Li, X.; Yue, W.; Ma, Y. Derivation and characteristics of pluripotent embryonic germ cells in duck. *Poult. Sci.* **2010**, *89*, 312–317. [[CrossRef](#)]
28. Anand, M.; Lázár, B.; Tóth, R.; Páll, E.; Patakiné Várkonyi, E.; Liptói, K.; Homolya, L.; Hegyi, Z.; Hidas, A.; Góczy, E. Enhancement of chicken primordial germ cell in vitro maintenance using an automated cell image analyser. *Acta Vet. Hung.* **2018**, *66*, 518–529. [[CrossRef](#)]
29. Chen, Y.C.; Lin, S.P.; Chang, Y.Y.; Chang, W.P.; Wei, L.Y.; Liu, H.C.; Huang, J.F.; Pain, B.; Wu, S.C. In vitro culture and characterization of duck primordial germ cells. *Poult. Sci.* **2019**, *98*, 1820–1832. [[CrossRef](#)]
30. Naito, M.; Harumi, T.; Kuwana, T. Long-term culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood and production of germline chimaeric chickens. *Anim. Reprod. Sci.* **2015**, *153*, 50–61. [[CrossRef](#)]
31. Kress, C.; Montillet, G.; Jean, C.; Fuet, A.; Pain, B. Chicken embryonic stem cells and primordial germ cells display different heterochromatic histone marks than their mammalian counterparts. *Epigenet. Chromatin* **2016**, *9*, 1–18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



6.2. OŚWIADCZENIE AUTORA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

mgr inż. Agata Szczerba
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Politechnika Bydgoska im. J. i J. Śniadeckich

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych stanowiących cykl publikacji rozprawy doktorskiej był następujący*:

1. Szczerba A., Kuwana T., Bednarczyk M. Concentration and total number of circulating primordial germ cells in Green-legged Partridgelike chicken embryos, Poultry Science (Elsevier), 2021, 100, 1, 319-324 DOI - <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.016>, pkt. MNiSW – 140 , Impact Factor - 2.659

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu:

- a) koncepcja
- b) metodologia
- c) przeprowadzenie badań
- d) analiza i obróbka danych
- e) przygotowanie oryginalnego tekstu
- f) recenzja i poprawki edytorskie

co stanowi 60 % indywidualnego wkładu w przygotowanie ww. publikacji.

2. Szczerba A., Kuwana T., Paradowska M., Bednarczyk M. In Vitro Culture of Chicken Circulating and Gonadal Primordial Germ Cells on a Somatic Feeder Layer of Avian Origin, Animals (MDPI), 2020, 70, 1769, DOI - <https://doi.org/10.3390/ani10101769>, pkt. MNiSW - 100 , Impact Factor - 2,323.

Wykonane zadania przez Doktoranta w ramach artykułu:

- a) koncepcja
- b) metodologia
- c) przeprowadzenie badań
- d) analiza i obróbka danych
- e) przygotowanie oryginalnego tekstu
- f) recenzja i poprawki edytorskie

co stanowi 60 % indywidualnego wkładu w przygotowanie ww. publikacji.

Bydgoszcz, 6.12.2021 r.
miejsowość, data

Agata Szczerba
Podpis Autora rozprawy doktorskiej


Podpis promotora

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

6.3. OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW ARTYKUŁÓW NAUKOWYCH

Co-author's Declaration

Ph.D. in Medical Science, Takashi Kuwana.....

(Professional title, name(s) and surname of the Co-author)

Shiga, JAPAN, Visiting Professor, Shiga University of Medical Science

(Workplace/affiliation)

DECLARATION

I declare that my author's contribution to the journal article/articles mentioned below was as follows*:

1. Szczerba A., Kuwana T., Bednarczyk M. Concentration and total number of circulating primordial germ cells in Green-legged Partridge-like chicken embryos, Poultry Science (Elsevier), 2021, 100, 1, 319-324 DOI - <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.016>, pkt. MNiSW – 140 , Impact Factor - 2.659.

Tasks completed as part of the article:

- a) conceptualization
- b) methodology
- c) investigation
- d) formal analysis and data curation
- e) writing—original draft preparation, review and editing,

which represents 25 % of the individual contribution to the preparation of the above-mentioned publication.

2. Szczerba A., Kuwana T., Paradowska M., Bednarczyk M. In Vitro Culture of Chicken Circulating and Gonadal Primordial Germ Cells on a Somatic Feeder Layer of Avian Origin, Animals (MDPI), 2020, 10, 1769, DOI - <https://doi.org/10.3390/ani10101769>, pkt. MNiSW – 100 , Impact Factor - 2.323.

Tasks completed as part of the article:

- a) conceptualization
- b) methodology
- c) investigation
- d) formal analysis and data curation
- e) writing—original draft preparation, review and editing,

which represents 25 % of the individual contribution to the preparation of the above-mentioned publication.

At the same time, I hereby agree to the submission of the above-mentioned paper(s) by M.Sc. Agata Szczerba as part of the doctoral dissertation based on a collection of published and thematically related scientific papers.

JAPAN, 09 Dec. 2021

Place, date

TAKASHI KUWANA

Co-author's signature

* In the case of two- or multi-author papers, declarations of a candidate for the doctoral degree and co-authors are required, indicating their substantive contribution to the creation of each paper (e.g. the creator of the research hypothesis, the originator of the research, performance of specific research – e.g. carrying out particular experiments, developing and collecting questionnaires, etc., analysis of the results, preparation of the article manuscript and others). Identification of the contribution of a given author, including a candidate for the doctoral degree, should be precise enough to allow for an accurate assessment of his/her participation and role in the creation of each paper.

Oświadczenie Współautora

Prof. dr hab. Marek Bednarczyk
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Politechnika Bydgoska im. J. i J. Śniadeckich

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionych artykułach naukowych był następujący*:

1. Szczerba A., Kuwana T., Bednarczyk M. Concentration and total number of circulating primordial germ cells in Green-legged Partridge-like chicken embryos, Poultry Science (Elsevier), 2021, 100, 1, 319-324 DOI - <https://doi.org/10.1016/j.psj.2020.08.016>, pkt. MNiSW – 140 , Impact Factor - 2.659
Wykonane zadania w ramach artykułu:
 - a) koncepcja
 - b) opieka naukowa
 - c) pozyskanie finansowania
 - d) przygotowanie oryginalnego tekstu
 - e) recenzja i poprawki edytorskie
 - f) nadzór i administrowanie projektemco stanowi 15 % indywidualnego wkładu w przygotowanie ww. publikacji.
2. Szczerba A., Kuwana T., Paradowska M., Bednarczyk M. In Vitro Culture of Chicken Circulating and Gonadal Primordial Germ Cells on a Somatic Feeder Layer of Avian Origin, Animals (MDPI), 2020, 70, 1769, DOI - <https://doi.org/10.3390/ani10101769>, pkt. MNiSW - 100 , Impact Factor - 2,323.
Wykonane zadania w ramach artykułu:
 - a) koncepcja
 - b) opieka naukowa
 - c) pozyskanie finansowania
 - d) przygotowanie oryginalnego tekstu
 - e) recenzja i poprawki edytorskie
 - f) nadzór i administrowanie projektemco stanowi 12 % indywidualnego wkładu w przygotowanie ww. publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez mgr inż. Agatę Szczerbę jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

Bydgoszcz, 08.12.2021r.
miejsowość, data


.....
podpis Współautora

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.

Oświadczenie Współautora

mgr inż. Michelle Paradowska
Katedra Biotechnologii i Genetyki Zwierząt
Wydział Hodowli i Biologii Zwierząt
Politechnika Bydgoska im. J. i J. Śniadeckich

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, iż mój wkład autorski w niżej wymienionym artykule naukowym był następujący*:

1. Szczerba A., Kuwana T., Paradowska M., Bednarczyk M. In Vitro Culture of Chicken Circulating and Gonadal Primordial Germ Cells on a Somatic Feeder Layer of Avian Origin, *Animals (MDPI)*, 2020, 10, 1769, DOI - <https://doi.org/10.3390/ani10101769>, pkt. MNiSW – 100 , Impact Factor - 2.323.
Wykonane zadania w ramach artykułu:
 - a) przygotowanie oryginalnego tekstu
 - b) recenzja i poprawki edytorskieco stanowi 3% indywidualnego wkładu w przygotowanie ww. publikacji.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie wyżej wymienionych prac przez mgr inż. Agatę Szczerbę jako część rozprawy doktorskiej opartej na zbiorze opublikowanych i powiązanych tematycznie artykułów naukowych.

08.12.2021, Bydgoszcz
miejsowość, data

Paradowska
podpis Współautora

* W przypadku prac dwu- lub wieloautorskich wymagane są oświadczenia kandydata do stopnia doktora oraz współautorów, wskazujące na ich merytoryczny wkład w powstanie każdej pracy (np. twórca hipotezy badawczej, pomysłodawca badań, wykonanie specyficznych badań – np. przeprowadzenie konkretnych doświadczeń, opracowanie i zebranie ankiet itp., wykonanie analizy wyników, przygotowanie manuskryptu artykułu i inne). Określenie wkładu danego autora, w tym kandydata do stopnia doktora, powinno być na tyle precyzyjne, aby umożliwić dokładną ocenę jego udziału i roli w powstaniu każdej pracy.