

KOMÓRKI MSC WYZIOLOWANE ZE SZPIKU KOSTNEGO TRANSGENICZNYCH ŚWIŃ PRAWIDŁOWO RÓŻNICUJĄ W CHONDROCYTY I OSTEOLASTY, ALE NIE W ADIPOCYTY *IN VITRO*

Jolanta Opiela, Joanna Jurkiewicz, Lechosław Gajda,
Agnieszka Wierzchoś-Hilczer

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

Przedstawiamy wyniki doświadczenia, gdzie komórki MSC (mezenchymalne komórki macierzyste) wyizolowane ze szpiku kostnego transgenicznych świń prawidłowo zróżnicowały w chondrocyty i osteoblasty, ale nie adipocyty, w przeciwieństwie do komórek pochodzących od świń nietransgenicznych w warunkach in vitro. Co ciekawe, zmuszeni byliśmy zmodyfikować pożywkę do hodowli MSC, jak i bazy do różnicowania we wszystkie linie dla świń transgenicznej, gdyż ta z powodzeniem stosowana u świń nietransgenicznych nie przynosiła efektów. Potencjał do hodowli in vitro, jak i różnicowania komórek MSC pozyskanych od zwierząt transgenicznych jest niższy niż obserwowany u zwierząt nietransgenicznych.

Słowa kluczowe: świnia, transgeniczne, MSC

Modyfikacja genetyczna zwierzęcia poprzez wstawienie transgeny w celu uzyskania określonego fenotypu (zamierzonego efektu) niesie ze sobą możliwość wystąpienia niezamierzonych efektów, a tych może być wiele i zróżnicowanych (Wang i in., 2017; NAS 2004). Niezamierzone skutki nie ograniczają się do produkcji zwierząt transgenicznych; są one również dobrze udokumentowane w konwencjonalnej hodowli zwierząt. Podwójne umięśnienie u bydła (Grobet i in., 1997) czy zespół stresu u świń (Wendt i in., 2000) to dwa takie przykłady. Wiele niezamierzonych efektów jest wykrywanych na wczesnych etapach badań i rozwoju, kiedy wytwarza się linie transgeniczne. Linie transgeniczne wykazujące niezamierzone efekty są zazwyczaj przerywane i rzadko kiedy są brane pod uwagę do komercjalizacji. Dlatego głównym problemem jest to, czy mogą wystąpić subtelne skutki, które mogą nie być łatwo widoczne u skądinąd zdrowego zwierzęcia, a które mimo to mogą mieć wpływ na bezpieczeństwo produktów pochodzących od zwierząt transgenicznych (TRG). Na przykład plejotropia może skutkować zmianą procesu metabolicznego, prowadzącą

do produkcji toksycznych metabolitów w jadalnych tkankach (Wang i in., 2017). Podobnie bioaktywne białko może być przeznaczone do ekspresji w niejadalnej tkance zwierzęcej, ale problemy z ekspresją ektopową mogą prowadzić do jego niezamierzonej obecności w jadalnych tkankach, np. wyrażony w gruczole mlekowym, a następnie wydzielany do mleka. Wiele niezamierzonych efektów będzie prawdopodobnie przewidywalnych na podstawie wiedzy o nowym białku i jego połączeniach metabolicznych, a nawet miejscu wstawienia transgenu (Codex Alimentarius Commission – CAC, 2003; WHO, 2000). Z biegiem czasu, wraz ze wzrostem wiedzy o systemach biologicznych i transgenezie, rozsądne wydaje się oczekiwanie, że przewidywalność wielu niezamierzonych skutków zostanie zwiększona, co ułatwi badanie przesiewowe pod kątem takich skutków, a wielu z nich można również zapobiec lub zminimalizować np. za pomocą ulepszonych technik projektowania wektorów (FAO, 2004). Jednak niezamierzone skutki, takie jak plejotropia, prawdopodobnie zawsze wystąpią. Ponieważ niezamierzone skutki mogą być szkodliwe, korzystne lub nawet neutralne w odniesieniu do zdrowia zwierzęcia lub bezpieczeństwa pochodzących od nich produktów, każdy przypadek lub zdarzenie należy ocenić osobno, aby określić jego znaczenie dla bezpieczeństwa produktu czy żywności.

Analiza fenotypowa została uznana za ważny element podejścia porównawczego, stosowanego zarówno do zwierząt transgenicznych (FAO, 2004), jak i klonowanych (FDA, 2003; Rudenko i in., 2004). W przypadku sklonowanych zwierząt „zasada zdrowego zwierzęcia” została dalej rozwinięta o monitorowanie zwierzęcia w trakcie jego życia i gromadzenie danych na temat jego stanu zdrowia na wszystkich ważnych etapach rozwojowych, np. okresu młodzieńczego i dojrzewania oraz po okresie dojrzewania (Rudenko i in., 2004). Tego rodzaju podejście do analizy fenotypowej można by w równym stopniu zastosować do zwierząt transgenicznych i w rzeczywistości może istnieć większy potencjał dla takiej analizy, ponieważ w przeciwieństwie do sklonowanych zwierząt prawdopodobne jest, że powstanie wiele pokoleń. Ponadto niektóre niezamierzone skutki wynikające z obecności transgenu mogą być wyrażane jako mutacje recesywne, a zatem mogą nie być widoczne, dopóki transgen nie będzie homozygotyczny w miejscu insercji (Wang i in., 2017).

Szereg różnych skutków może być widocznych u zwierzęcia w wyniku transgenezy i/lub klonowania, ale niekoniecznie muszą one przenosić się na produkty lecznicze i żywnościowe, a jeśli tak, niekoniecznie mają wpływ na ich bezpieczeństwo lub wartość odżywczą. Chociaż analiza składu produktu czy żywności jest tak naprawdę tylko rozszerzeniem analizy fenotypowej, wyniki mają pod wieloma względami większą wartość, ponieważ można je wykorzystać ilościowo do bezpośredniego rozwiązania kwestii bezpieczeństwa produktu czy żywności i jej wartości odżywczej.

Idąc za tym trendem, w niniejszym doświadczeniu oceniliśmy zdolność MSC pozyskanych ze szpiku świń transgenicznych do prawidłowego różnicowania w 3 linie komórkowe. Wyjściowym materiałem były mezenchymalne komórki macierzyste (z ang. MSCs) uzyskane od świń po uboju, dlatego nasze badania nie wymagały zgody komisji etycznej. Część komórek poddano różnicowaniu *in vitro* w chondrocyty, osteocyty i adipocyty, które oceniono jakościowo celem wykazania wpływu transgenezy na produkt wtórny pozyskany od zwierzęcia transgenicznego. Zatem celem badań było sprawdzenie, czy zwierzęta transgeniczne mają niższy potencjał do hodowli

in vitro zarówno pod kątem wyprowadzania pierwotnej linii i jej hodowli, jak również zdolności do różnicowania komórek.

Material i metody

Uzyskanie szpiku od świń transgenicznych po uboju, u których spowodowano knock-out genu *GGTA1* (+/- *GGTA1*) z zastosowaniem technologii ZNF (*ang. Zinc Finger Nuclease*) (Lipiński i in., 2019)

Pobranie szpiku – Szpik pobrano za pomocą specjalnej igły do biopsji i aspiracji szpiku kostnego (Medical Device Technologies, INC). Nakłuto talerze kości biodrowej oraz kość kulszową. Szpik w ilości około 6 ml na punkt nakłucia aspirowano do heparynizowanej strzykawki (Opiela i in., 2013, 2016).

Izolacja MSC ze szpiku – Próbkę szpiku mieszano z solą fizjologiczną (PBS Biomed, Lublin) w stosunku 1:1, nawarstwiano na roztwór fikolu (Stem Cells Technologies, USA) i wirowano. Zebraną frakcję komórek jednojądrzastych zawieszono w PBS i wirowano. Osadzone komórki zawieszano w pożywce DMEM o niskim stężeniu glukozy z dodatkiem 10% surowicy bydlęcego płodu (FBS), 1% roztworu antybiotyku i substancji przeciwgrzybiczej, 1% glutamaksu (Invitrogen, USA). Hodowlę prowadzono w butelkach hodowlanych 75 cm² (T75) w 17 ml pożywki do utworzenia kolonii o max 90% konfluencji (Opiela i in., 2013, 2016).

Wyprowadzenie i hodowla *in vitro* MSC

Linie komórkowe utrzymywano w warunkach standardowych: w temperaturze 37°C, w atmosferze wzbogaconej 5% CO₂ i wilgotności około 100% w warunkach normoksji (21% O₂) w inkubatorze ThermoScientific Heracell CO₂ (Opiela i in., 2013, 2016).

Analiza cytometryczna poziomu ekspresji markerów CD90 i CD31,CD34

W celu oceny fenotypu komórek MSC wykonano analizę opartą na wieloparametrycznej cytometrii przepływowej. Aby ocenić poziom ekspresji zewnątrzkomórkowych markerów związanych z pluri- i multipotencją komórki pasażowano, wirowano i zawieszano w buforze PBS zawierającym 1% BSA. 100 µl zawiesiny komórkowej inkubowano przez pół godziny w temperaturze 4°C z odpowiednim przeciwciałem pierwszorzędowym, skierowanym przeciw świńskiemu lub końskiemu antygenom powierzchniowym komórek MSC. Po inkubacji komórki przepłukano dwukrotnie buforem PBS, za każdym razem wirując przez 5 min przy prędkości 1200 obrotów/min, a następnie zawieszano w 100 µl roztworu przeciwciała II-rzędowego sprzężonego z odpowiednim związkiem znakującym (np. biotyną), skierowanego przeciw wykorzystanemu przeciwciałom pierwszorzędowym w PBS + 1% BSA i inkubowano przez pół godziny w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki przepłukano dwukrotnie buforem PBS, za każdym razem wirując przez 5 min przy prędkości 1200 obrotów/min, a następnie zawieszano w 100 µl roztworu np. streptawidyny sprzężonej z barwnikiem APC (*ang. Allophycocyanin*), w PBS + 1% BSA i inkubowano przez

15 min w ciemności, w temperaturze pokojowej. Po inkubacji komórki płukano ponownie buforem PBS, wirowano, a następnie zawieszano w 250 μ l 1x stężonego buforu utrwalającego CellFix (BD Biosciences).

Analizy cytometryczne przeprowadzono na cytometrze przepływowym firmy DAKO Galaxy. Do analizy wyników wykorzystano WinList 7.0 software (Verity SH).

Mrożenie MSC

Komórki po osiągnięciu około 90% konfluencji trawiono roztworem trypsyny/EDTA 0,25% po uprzednim zebraniu medium i odpłukaniu pozostałości pożywki buforem PBS. Następnie po inaktywowaniu trypsyny roztworem bydlęcej surowicy płodowej (FBS) komórki zbierano do próbek wirowniczych, a następnie wirowano (5 min; 500 g). Po odciążeniu supernatantu komórki zawieszano w 0,5 ml 10% DMSO i przenoszono do krioprobówek. Krioprobówki przenoszono do pojemnika do mrożenia materiału biologicznego (Mr. Frosty™ Freezing Container, Nalgene, Thermo Scientific,) wypełnionego 100% alkoholem izopropylowym. Następnie pojemnik umieszczano w zamrażarce niskotemperaturowej -80°C na 24 godz. Mr. Frosty gwarantuje powtarzalne zamrażanie preparatów w tempie $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Następnie próbki przenoszono do kontenera wypełnionego ciekłym azotem (-196°C).

Różnicowanie MSC w adipocyty, osteoblasty i/lub chondrocyty

Wszystkie odczynniki wykorzystane w naszych doświadczeniach zakupiono w firmie Sigma-Aldrich, Polska. Po izolacji pojedynczych kolonii MSCs część hodowli została poddana różnicowaniu w kierunku osteoblastów i adipocytów w DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, D5546) świni kontrolnej i w DME-M/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham) – świni transgenicznej, o niskiej zawartości glukozy, a chondrocytów o wysokiej zawartości glukozy, w obydwu przypadkach z dodatkiem 17% FBS, 1% glutamaksu (100x) oraz 1% roztworu antybiotyku i substancji przeciwgrzybiczej (100x) (Marion i Mao, 2006).

Pożywkę różnicującą kolonie MSCs w kierunku osteoblastów uzupełniono: 145 nM deksametazonu, 20 mM β -glicerolofosforanu and 50 μ M 2-fosforanu kwasu L-askorbinowego (Jaiswal i in., 1997; Opiela i in., 2013, 2016).

Pożywkę różnicującą kolonie MSCs w kierunku adipocytów uzupełniono: 7,25 μ M deksametazonu, 0,5 μ M izobutylometyloksantyny i 50 μ M indometacyny (Opiela i in., 2013) oraz zmodyfikowaną wersją stanowiącą pożywkę indukcyjną zastosowaną przez pierwsze trzy dni hodowli o następującym składzie: 33 μ M biotyny, 0,1 μ M deksametazonu, 1 μ M insuliny, 200 μ M indometacyny, 17 μ M kwasu D-pantotenowego, 10 μ g/ml transferyny ludzkiej, 0,2 nM soli sodowej trijodotyroniny, 250 μ M 3-izobutyl-1-metyloksantyny, a przez kolejne dni hodowli pożywkę różnicującą zawierającą: 33 μ M biotyny, 0,1 μ deksametazonu, 1 μ M insuliny, 200 μ M indometacyny, 17 μ M kwasu D-pantotenowego, 10 μ g/ml transferyny ludzkiej, 0,2 nM soli sodowej trijodotyroniny (Pittenger i in., 1999; Strutt i in., 1996).

Pożywkę różnicującą kolonie MSCs w kierunku chondrocytów uzupełniono: 100 nM deksametazonu, 50 μ g/ml 2-fosforanu kwasu L-askorbinowego, 40 μ g/ml L-proliny, 1 nM pirogromianu sodu, 1% insuliny transferyny selenu i 10 ng/ml TGF- β 1 (transformujący czynnik wzrostu beta 1) (Branly i in., 2017).

Hodowla komórek MSC stanowiących kontrolę negatywną prowadzona była w pożywce o niskiej zawartości glukozy DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) z dodatkiem 10% bydlęcej surowicy płodowej (FBS), 1% glutamaksu (100x) oraz 1% roztworu antybiotyku i substancji przeciwgrzybiczej (100x) (Marion i Mao, 2006).

Barwienie zróżnicowanych komórek

Zróżnicowanie komórek MSC potwierdzano przy wykorzystaniu specyficznych barwników. Przed barwieniem wszystkie trzy typy zróżnicowanych komórek MSC oraz komórek MSC stanowiących kontrolę negatywną utrwalano w 4% paraformaldehydzie przez 30 min w 4°C, a następnie przepłukiwano w PBS.

Obecność osteoblastów potwierdzano barwiąc utrwalone komórki 2% czerwienią alizarynową przez 30 min. Nadmiar barwnika wypłukiwano wodą destylowaną. Obecność w obrazie mikroskopowym czerwonych wewnątrzkomórkowych zabarwień świadczyła o obecności soli wapnia czyli pozytywnej reakcji (Sottile i in., 2002). Dodatkowo osteoblasty barwiono przy wykorzystaniu gotowego zestawu do pokrywania srebrem wg. von Kossa (Merck). W tym przypadku komórki traktowano najpierw 5% azotanem srebra, a następnie 5% tiosiarczanem sodu. Widoczne czarne i ciemnobrunatne osady świadczyły o obecności soli wapnia. Zróżnicowanie komórek MSC w kierunku adipocytów potwierdzano, barwiąc utrwalone komórki roztworem czerwieni oleistej O. Najpierw utrwalone komórki przepłukiwano 60% roztworem alkoholu izopropylowego, a następnie poddawano barwieniu 0,5% roztworem czerwieni oleistej przez 1 godz. Wybarwione komórki ponownie przepłukiwano 60% roztworem alkoholu izopropylowego, a na końcu wodą destylowaną. Obecność w obrazie mikroskopowym zabarwionych na czerwono kropeł tłuszczu świadczyła o pozytywnej reakcji (Sottile i in., 2002; Rentsch i in., 2010).

W celu potwierdzenia zróżnicowania komórek MSC w kierunku chondrocytów utrwalone komórki barwiono 1% roztworem błękitu alcjanowego, przygotowanego w 3% kwasie octowym przez 30 min. Następnie komórki przepłukiwano roztworem 0,1 N kwasu solnego i oceniano pod mikroskopem świetlnym. Obecność zabarwionych na błękitno skupisk komórek świadczyła o pozytywnej reakcji (Rentsch i in., 2010).

Wszystkim wyżej wymienionym sposobom barwienia poddawano komórki MSC stanowiące kontrolę negatywną dla zróżnicowanych komórek, nie obserwując charakterystycznych dla ich obecności wybarwień.

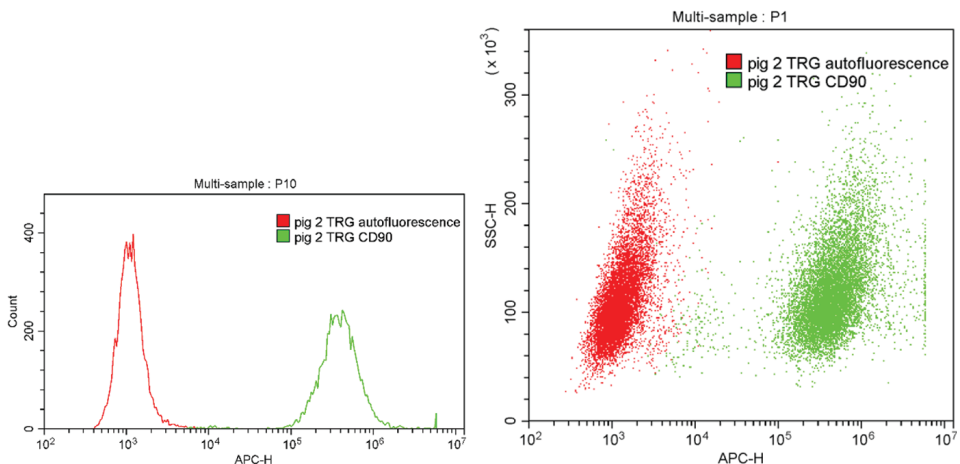
Wyniki

1. Pobrano poubojowo szpik kostny i wyizolowano komórki MSC od:
 - 10 osobników nietransgenicznej świni przyżyciowo (kontrola do transgenu GGTA1 po uboju)
 - 4 osobników transgenicznej świni
2. Cytometrycznie oceniono poziom ekspresji markerów pozytywnych i negatywnych dla świń transgenicznych (tab. 1). Wyniki ekspresji markerów pozytywnych i negatywnych dla świń nietransgenicznych przedstawiono wcześniej w pracy Opieli i in., 2016 oraz Gurgula i in., 2017.

Tabela 1. Wyniki analizy cytometrycznej – procentowa liczba komórek pozytywnych dla markerów MSC świni transgenicznej zarówno pozytywnych, jak i negatywnych
 Table 1. Results of flow cytometric analysis – percentage of cells positive for MSC markers of transgenic pig, both positive and negative

(+/- <i>GGTA1</i>)	Marker pozytywny Positive marker	Markery negatywne Negative markers	
	CD90	CD13	CD34
Świnia 1 Pig 1	98,6	0	0
Świnia 2 Pig 2	98,4	14,7	3,9
Świnia 3 Pig 3	97,8	1	1

Oceniono markery pozytywne i negatywne przy wykorzystaniu cytometru przepływowego komórek MSC wyprowadzonych ze szpiku. Ekspresja markerów negatywnych CD13 i CD34 oraz markeru pozytywnego CD90 potwierdziła mezenchymalny charakter analizowanych komórek (tab. 1, rys. 1).



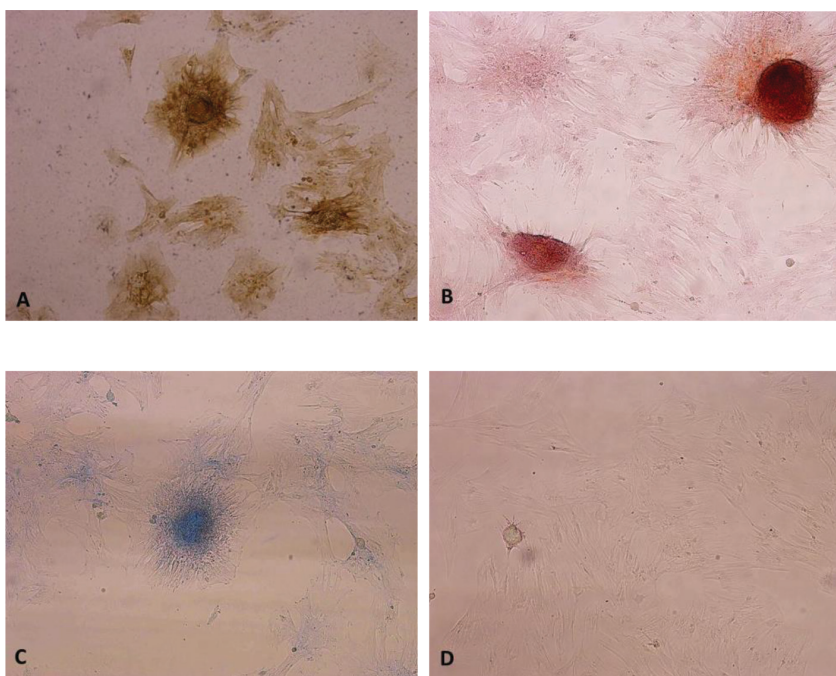
Rys. 1. Na powyższych obrazach (histogram i dotplot) widać wyraźną separację populacji komórek kontrolnych (autofluorescencja) od populacji komórek pozytywnie wybarwionych dla antygenu CD90
 Fig. 1. The above images (histogram and dotplot) show that the control cell population is clearly separated (autofluorescence) from the population of cells stained positively for CD90 antigen

3. Różnicowanie wykonano na 6 świniami nietransgenicznymi i 2 transgenicznymi, jednocześnie różnicując w 3 linie: adipocyty, osteoblasty i chondrocyty. Co ciekawe, zmuszeni byliśmy do modyfikacji pożywki bazowej do hodowli *in vitro* i różnicowania MSC świni transgenicznej z powodu zahamowania lub niskiej proliferacji. Hodowle *in vitro* prowadzono w pożywce DMEM+F12, natomiast u świni nietransgenicznej wystarczyła pożywka DMEM. Różnicowanie MSC świni transgenicznej zakończono sukcesem tylko dla linii osteoblastów i chondrocytów, natomiast różnicowanie MSC świni nietransgenicznej (kontrola) zakończono sukcesem dla wszystkich linii (tab. 2).

Tabela 2. Wyniki różnicowania w kierunku osteoblastów, adipocytów i chondrocytów w komórkach izolowanych ze szpiku kostnego świni transgenicznej i nietransgenicznej (kontrola)
 Table 2. Results of differentiation into osteoblasts, adipocytes and chondrocytes in cells isolated from the bone marrow of transgenic and non-transgenic pig (control)

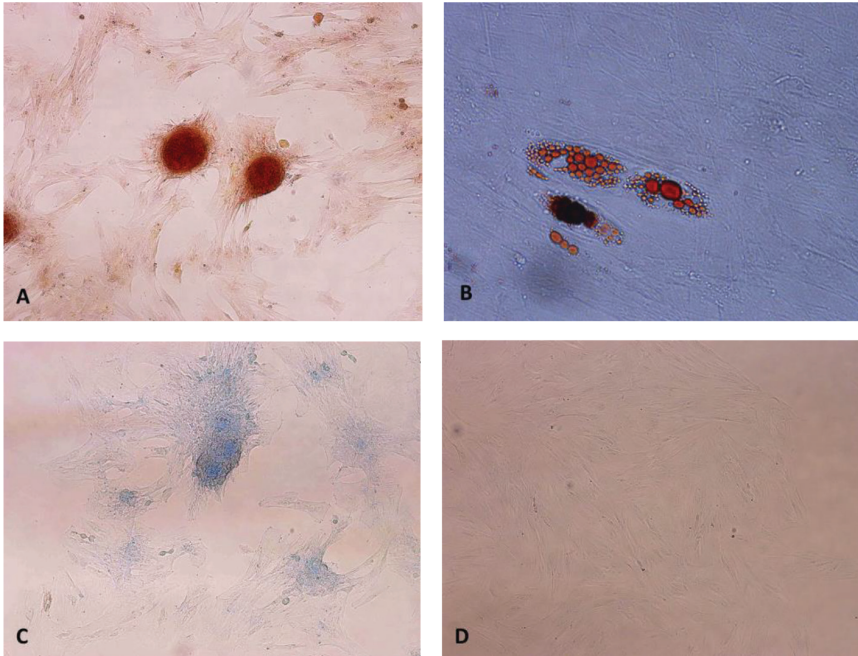
Różnicowanie komórek MSC Differentiation of MSC cells	Barwienie Staining	Świnie Pigs	
		transgeniczne transgenic	nietransgeniczne non-transgenic
Osteoblasty Osteoblasts	von Kossa i/lub Alizarin Red von Kossa and/or Alizarin Red	+	+
Adipocyty Adipocytes	Oil Red O	-	+
Chondrocyty Chondrocytes	Alcian Blue	+	+
Kontrola Control	każde z ww. each of the above	-	-

Poniżej przedstawiono przykładowe zdjęcia barwienia osteoblastów, chondrocytów oraz adipocytów zróżnicowanych z komórek mezenchymalnych świni transgenicznej (rys. 2) i nietransgenicznej (rys. 3).



Rys. 2. Barwienie komórek mezenchymalnych świni transgenicznej: A – osteoblasty barwione zestawem do barwienia wg metody von Kossa, B – osteoblasty barwione przy użyciu czerwieni alizarynowej, C – chondrocyty barwione przy użyciu błękitu alcjanowego, D – kontrola negatywna: barwienie adipocytów przy użyciu czerwieni olejowej O

Fig. 2. Staining of mesenchymal cells of transgenic pig: A – osteoblasts stained with von Kossa, B – osteoblasts stained with Alizarin Red, C – chondrocytes stained with Alcian Blue, D – negative control: adipocytes stained with Oil Red O



Rys. 3. Barwienie komórek mezenchymalnych świni nietransgeniczej: A – osteoblasty barwione przy użyciu czerwieni alizarynowej, B – adipocyty barwione przy użyciu czerwieni olejowej O, C – chondrocyty barwione przy użyciu błękitu alcjańskiego, D – kontrola negatywna: barwienie osteoblastów przy użyciu błękitu alcjańskiego

Fig. 3. Staining of mesenchymal cells of non-transgenic pig: A – osteoblasts stained with Alizarin Red, B – adipocytes stained with Oil Red O, C – chondrocytes stained with Alcian Blue, D – negative control: osteoblasts stained with Alcian Blue

Wnioski

MSC świni nietransgeniczej oceniono w ramach innego doświadczenia – wyniki są dostępne w publikacji Gurgula i in. (2017). Ekspresja markerów świni transgeniczej nie odbiega od świni nietransgeniczej. Zastanawiają dwa odmienne wyniki u świni transgeniczej:

1. Konieczność zmiany pożywki do hodowli MSC, jak i bazy do różnicowania we wszystkie linie.
2. Brak różnicowania MSC w adipocyty.

Omówienie wyników

Biotechnologia zwierząt to szybko rozwijająca się dziedzina, która oferuje wiele potencjalnych korzyści zarówno dla medycyny, jak i dla produkcji żywności. Ponieważ ksenotransplantacje, produkcja leków, jak i komercjalizacja żywności pochodzącej od zwierząt transgenicznych i sklonowanych wkrótce stanie się rzeczywistością, ważne jest, aby istniała metodologia umożliwiająca odpowiednią ocenę bezpieczeństwa tych produktów. W przypadku zwierząt transgenicznych i sklonowanych więk-

szą wagę można przypisać analizie fenotypowej w ramach oceny bezpieczeństwa, ponieważ stan zdrowia prawdopodobnie będzie bardziej czułym wskaźnikiem bezpieczeństwa produktu i żywności u zwierząt niż u roślin. Obecnie świat jest w trakcie opracowania szczegółowych wytycznych, szczególnie w dziedzinie charakterystyki molekularnej w zakresie oceny bezpieczeństwa produktu i żywności pochodzącej od zwierząt transgenicznych i klonowanych, aby przejść od teorii hipotetycznej do rzeczywistości. Proponowane przez nas zadanie badawcze wpisuje się w rozwiązanie powyższego problemu zatem ma walory nie tylko poznawcze, ale też aplikacyjne.

Nasze wyniki zaskoczyły nas, nie oczekiwaliśmy różnic w potencjale do hodowli *in vitro*, jak i różnicowania komórek MSC pozyskanych od zwierząt transgenicznych. Co ciekawe, wydaje się, że jednak nie można postawić znaku równości między zwierzętami modyfikowanymi a niemodyfikowanymi. Nie można też porównywać naszych wyników z wynikami innych autorów – nikt takich prac nie prowadził. Dlatego przeszukaliśmy literaturę pod kątem publikacji porównujących zwierzęta transgeniczne z nietransgenicznymi. Poniżej przedstawiamy kilka z nich:

Najbardziej zbliżona praca do naszej została opublikowana przez Kumara i in. w 2012. Autorzy ci różnicowali MSC pozyskane z tkanki tłuszczowej od świń GTKO/hCD46, czyli z wyłączonym genem $\alpha 1,3$ -galactylozylotransferazy i wprowadzonym ludzkim genem *CD46*. Z sukcesem różnicowali MSC od świń transgenicznych w 3 linii komórkowej, w tym adipocyty. Należy jednak zwrócić uwagę, że materiałem, z którego izolowano MSC, była tkanka tłuszczowa, a mówimy o adipocytach, które dają początek tkance tłuszczowej. Ponadto, jak podają autorzy artykułu, tkanka tłuszczowa ma najwyższą częstotliwość *fibroblastoid colony-forming unit* (CFU-F). Częstość CFU-F komórek pozyskanych ze szpiku kostnego wynosi około 0,01%, co sugeruje, że około 2×10^8 komórek szpiku odpowiada 10 g świńskiej tkanki tłuszczowej, z jakiej izolowano MSC w cytowanym artykule. Zastosowana pożywka do różnicowania odbiega również składem od naszej (1 μ M dexametazon, 10 μ g/mL ludzka rekombinowana insulina, 0,5 mM 3-isobutyl-1-metyloksantyna (IBMX) i 10 mM indometacyna). Hodowlę prowadzono w butelkach pokrytych kolagenem, co również wpływa na efektywność różnicowania.

Bhuiyan i in. (2004) wykazali różne kompetencje rozwojowe w odpowiedzi na suplementację białkiem w pożywce KSOM między nietransgenicznymi i transgenicznymi klonowanymi zarodkami bydła. Hosseini i in. (2015) wykazali kontrastowy wpływ pożywek do hodowli zarodków G1.2/G2.2 i SOF1/SOF2 na rozwój nietransgenicznych i transgenicznych klonowanych zarodków kóz przed i po implantacji. Stwierdzili oni znacząco wyższy rozwój *in vitro* klonowanych zarodków kóz w pożywce G1.2/G2.2 w porównaniu z pożywką SOF1/SOF2. *In vivo* zaobserwowano jednak znacząco wyższy rozwój zarodków klonowanych w pożywce SOF1/SOF2 w porównaniu z pożywką G1.2/G2.2. Nawet jeśli zarodki SCNT rozwinięte w G1.2/G2.2 różniły się rozwojowo i transkrypcyjnie od odpowiedników SOF1/SOF2, liczne badania ujawniły dużą rozbieżność między transkryptomami sklonowanych i zapłodnionych zarodków kontynuujących rozwój w tej samej pożywce do hodowli zarodków (Sawai i in., 2009; Somers i in., 2006). To doprowadziło autorów do ustalenia, czy rozbieżność między wynikami G1.2/G2.2 i SOF1/SOF2 może mieć związek z metodą produkcji zarodków. Jeśli chodzi o zarodki SCNT, rozwój blastocyst u zarod-

ków IVF wyhodowanych w G1.2/G2.2 był znacznie wyższy niż w odpowiednikach SOF1/SOF2, mimo że profile ekspresji blastocyst otrzymanych w obu pożywkach do hodowli zarodków były porównywalne. Wyniki te sugerują, że odchylenia obserwowane w ekspresji genów sklonowanych zarodków, ale nie normalnych zarodków po hodowli w G1.2/G2.2, mogą wynikać z błędów powstałych podczas przeprogramowywania komórek somatycznych i/lub nietypowych wymagań pożywki hodowlanej klonowanych zarodków (Chung i in., 2002). Na przykład, porównując wiele różnych pożywek hodowlanych do hodowli *in vitro* sklonowanych zarodków myszy, Chung i in. (2002) wykazali, że chociaż glukoza jest toksyczna podczas wczesnego podziału normalnych zarodków, to jest korzystna w fazie 1-komórkowej sklonowanych zarodków, gdy są hodowane w pożywce CZB. Wykazali również, że chociaż pożywka zoptymalizowana pod kątem potasu jest optymalna dla wczesnych podziałów zarodka u myszy, to nie działa dobrze w przypadku sklonowanych zarodków myszy. Zatem reasumując stwierdzono, że pożywki do hodowli zarodków i/lub metody produkcji zarodków mogą nieodwracalnie wpłynąć na rozwój klonowanych zarodków po implantacji poprzez określone szlaki molekularne (Hosseini i in., 2015). Trzczińska i in. (2009) określili zmiany apoptotyczne i uszkodzenia chromatyny u nietransgenicznym i transgenicznym knurów posiadających ludzki gen alfa1,2-fukozylotransferazy. Pobrano pięć ejakulatów od sześciu knurów transgenicznym (TG) i sześciu nietransgenicznym (NTG), obu mieszańców polskiej rasy landrace i large white. Nie stwierdzono istotnych różnic w odsetku wszystkich wykrytych subpopulacji plemników między knurami TG i NTG. Podobnie analiza struktury chromatyny nie wykazała statystycznych różnic w uszkodzeniach chromatyny plemników między knurami TG i NTG. Podsumowując, obecność ludzkiego genu alfa1,2-fukozylotransferazy w genomie knurów TG nie powodowała zaburzeń procesu spermatogenezy prowadzących do zwiększonej produkcji apoptotycznych plemników. Ponadto niski poziom plemników z uszkodzoną chromatyną u knurów TG potwierdza wysoką stabilność procesu spermatogenezy u badanych knurów TG. Z kolei Bryła i in. (2010) porównali zdolność zapłodnienia plemników 6 knurów transgenicznym (TG) i 6 nietransgenicznym (NTG) w oparciu o analizy zarodków powstałych w wyniku inseminacji nasieniem tych konkretnych knurów. Bryła i in. (2010) stwierdzili, że ekspandowane blastocysty, pochodzące od loszek inseminowanych nasieniem knura TG i NTG nie różniły się istotnie pod względem fragmentacji DNA i nie było różnic w aktywności kaspazy-3. Zatem obserwacje są różne, Bryła i in. (2010) oraz Trzczińska i in. (2009) nie zaobserwowali różnic między zwierzętami TRG a nie-TRG, pozostali takowe różnice odnotowują. Nasze doświadczenie jest stosunkowo proste, jednak wynik wiele mówi i może stanie się zachętą do kontynuowania tego typu prac przez innych.

Podziękowania

Dziękujemy prof. Ryszardowi Słomskiemu i prof. Zdzisławowi Smorągowi za udzielenie materiału, czyli świń transgenicznym do badań. Dziękuję dr wet. Jarosławowi Wieczorkowi za pobieranie szpiku kostnego oraz Andrzejowi Kuźmie za pomoc techniczno-weterynaryjną. Dziękuję Prezesowi ZD Żerniki Wielkie za współpracę przy doświadczeniu.

Piśmiennictwo

- Bhuiyan M.M., Cho J.K., Jang G., Park E.S., Kang S.K., Lee B.C., Hwang W.S. (2004). Effect of protein supplementation in potassium simplex optimization medium on preimplantation development of bovine non-transgenic and transgenic cloned embryos. *Theriogenology*, 62 (8): 1403–1416.
- Branly T., Bertoni L., Contentin R., Rakic R., Gomez-Leduc T., Desancé M., Hervieu M., Legendre F., Jacquet S., Audigié F., Denoix J.M., Demoor M., Galéra F. (2017). characterization and use of equine bone marrow mesenchymal stem cells in equine cartilage engineering. Study of their hyaline cartilage forming potential when cultured under hypoxia within a biomaterial in the presence of BMP-2 and TGF- β 1. *Stem Cell Rev. Rep.*, 13: 611–630.
- Bryła M., Trzcńska M., Wieczorek J., Słomski R., Smorąg Z. (2010). Effect of semen quality in transgenic boars on the developmental competence of preimplantation embryos. *Anim. Reprod. Sci.*, 118 (1): 77–82.
- Chung Y.G., Mann M.R., Bartolomei M.S., Latham K.E. (2002). Nuclear-cytoplasmic “tug of war” during cloning: effects of somatic cell nuclei on culture medium preferences of preimplantation cloned mouse embryos. *Biol. Reprod.*, 66: 1178–1184.
- Codex Alimentarius Commission (CAC) (2003). Report of the 26th Session of the CAC, 30 June – 7 July, Rome. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 36 pp.
- Food and Agriculture Organization (FAO) (2004). Safety assessment of foods derived from genetically modified animals, including fish. FAO Food and Nutrition Paper 79. FAO, Rome, 36 pp.
- Food and Drug Administration (FDA) (2003). Animal cloning: a risk assessment, draft executive summary. United States Food and Drug Administration, Rockville MD, 11 pp. Website: www.fda.gov/cvm/Documents/CLRAES.pdf (dostęp 14.04.2005).
- Grobet L., Royo Martin L.J., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoerberlein A., Dunner S., Ménissier F., Massabanda J., Fries R., Hanset R., Georges M. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genet.*, 17 (1): 71–74.
- Gurgul A., Opiela J., Pawlina K., Szmatoła T., Bochenek M., Bugno-Poniewierska M. (2017). The effect of histone deacetylase inhibitor trichostatin A on porcine mesenchymal stem cell transcriptome. *Biochimie*, 139: 56–73.
- Hosseini S.M., Hajian M., Ostadhosseini S., Forouzanfar M., Abedi P., Jafarpour F., Gourabi H., Shahverdi A.H., Vosough A., Ghanaie H.R., Nasr-Esfahani M.H. (2015). Contrasting effects of G1.2/G2.2 and SOF1/SOF2 embryo culture media on pre- and post-implantation development of non-transgenic and transgenic cloned goat embryos. *Reprod. Biomed Online*, 31 (3): 372–383.
- Jaiswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P. (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.*, 64 (2): 295–312.
- Kumar G., Hara H., Long C., Shaikh H., Ayares D., Cooper D.K., Ezzelarab M. (2012). Adipose-derived mesenchymal stromal cells from genetically modified pigs: immunogenicity and immune modulatory properties. *Cytherapy*, 14 (4): 494–504.
- Lipiński D., Nowak-Terpiłowska A., Hryhorowicz A., Jura J., Korcz A., Słomski R., Juzwa W., Mazurkiewicz N., Smorąg Z., Zeyland J. (2019). Production of ZFN-mediated GGTA1 knock-out pigs by microinjection of gene constructs into pronuclei of zygotes. *Pol. J. Vet. Sci.*, 22, 1: 91–100.
- Marion W.N., Mao J.J. (2006). Mesenchymal stem cells and tissue engineering. *Methods Enzymol.*, 420: 339–481.
- National Academy of Science (2004). Safety of genetically engineered foods, approaches to assessing unintended health effects. Sub-report on methods and mechanisms of genetic manipulation and cloning of animals. The National Academies Press, Washington, DC, pp. 217–235.
- Opiela J., Bartel Ż., Romanek J., Wieczorek J., Wilczek P. (2013). The quality of porcine mesenchymal stem cells and their osteo- and adipogenic cell derivatives – the level of proapoptotic BAD protein expression. *Ann. Anim. Sci.*, 13 (4): 753–763.
- Opiela J., Lipinski D., Romanek J., Juzwa W., Bochenek M., Wilczek P. (2016).

- MMP-2, TIMP-2, TAZ and MEF2a transcript expression in osteogenic and adipogenic differentiation of porcine mesenchymal stem cells. *Annals Anim Sci.*, 16 (2): 369–385.
- Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W., Craig S., Marshak D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284 (5411): 143–147.
- Rentsch C., Hess R., Rentsch B., Hofman A., Manthey S., Scharnweber D., Biewener A., Zwick H. (2010). Ovine bone marrow mesenchymal stem cells: isolation and characterization of the cells and their osteogenic differentiation potential on embroidered and surface-modified polycaprolactone-co-lactide scaffolds. *In vitro Cell Dev. Biol. – Animal*, 46: 624–634.
- Rudenko L., Matheson J.C., Adams A.L., Dubbin E.S., Greenlees K.J. (2004). Food consumption risks associated with animal clones: what should be investigated? *Cloning Stem. Cells*, 6 (2): 79–93.
- Sawai K. (2009). Studies on gene expression in bovine embryos derived from somatic cell nuclear transfer. *J. Reprod. Dev.*, 55: 11–16.
- Somers J., Smith C., Donnison M., Wells D.N., Henderson H., McLeay L., Pfeffer P.L. (2006). Gene expression profiling of individual bovine nuclear transfer blastocysts. *Reproduction*, 131 (6): 1073–1084.
- Sottile V., Halleux C., Bassilana F., Keller H., Seuwen K. (2002). Stem cell characteristics of human trabecular bone-derived cells. *Bone Vol.*, 30 (5): 699–704.
- Strutt B., Khalil W., Killinger D. (1996). Growth and differentiation of human adipose stromal cells in culture. *W: Methods in Molecular Medicine: Human Cell Culture Protocols*, Jones G.E. (red.). Humana Press Inc., Totowa, NJ., ss. 41–51.
- Trzcńska M., Bryła M., Bochenek M., Słomski R., Smorąg Z. (2009). Assessment of plasma membrane and chromatin structure of sperm from transgenic and non-transgenic boars. *Theor. Appl. Genet.*, 72 (8): 1141–1147.
- Wang Q., Shi N., Shang Y., Liu X., Fu W., Zhao Y., Pan D., Xu W., Lin X. (2017). Comprehensive molecular characterization of a transgenic pig expressing hCD46 gene. *Gene*, 30, 626: 376–385.
- Wendt M., Bickhardt K., Herzog A., Fischer A., Martens H., Richter T. (2000). Porcine stress syndrome and PSE meat: clinical symptoms, pathogenesis, etiology and animal rights aspects. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.*, 113 (5): 173–190.
- World Health Organization (WHO) (2000). Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on foods derived from biotechnology, 29 May – 2 June, Geneva, WHO/SDE/PHE/FOS/00.6. WHO, Geneva, 35 pp.

Zatwierdzono do druku: 24 XI 2021

JOLANTA OPIELA, JOANNA JURKIEWICZ, LECHOSŁAW GAJDA,
AGNIESZKA WIERZCHOŚ-HILCZER

MSC cells isolated from the bone marrow of transgenic pigs properly differentiate into chondrocytes and osteoblasts but not into adipocytes *in vitro*

SUMMARY

We present the results of a simple experiment where MSC cells isolated from the bone marrow of transgenic pigs correctly differentiated *in vitro* into chondrocytes and osteoblasts but not adipocytes, in contrast to non-transgenic pigs. Interestingly, we had to modify the MSC culture medium and the basal medium for differentiation into all lines for the transgenic pig, because the one successfully used in non-transgenic pigs did not bring any results. The potential for *in vitro* culture and differentiation of MSC cells obtained from transgenic animals is lower than that observed in non-transgenic animals.

Key words: pig, transgenic, MSC, differentiation