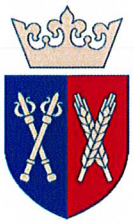
MAŁGORZATA PIERZCHALSKA

AUTOREFERAT

Organoidy jelitowe otrzymane z zarodków kurzych

Charakterystyka nowego modelu i jego wykorzystanie do badania wpływu probiotyków oraz ligandów receptorów Toll-podobnych na śluzówkę przewodu pokarmowego

Katedra Biotechnologii Żywności
Wydział Technologii Żywności
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie



1. IMIĘ I NAZWISKO: Małgorzata Pierzchalska

2. POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE

- magister biologii (z wyróżnieniem, specjalność biologia molekularna) – Kraków, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Biologii Molekularnej – 1990.

  Tytuł pracy magisterskiej: *Badania nad rolą filamentów aktynowych w destabilizacji powierzchni komórki indukowanej hipertonicznym stężeniem chlorku sodu.* Promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Korohoda.

- doktor nauk biologicznych – Kraków, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Biologii Molekularnej (dziedzina: nauki biologiczne, dyscyplina: biologia, specjalność: biologia komórki) – 25.11.1997.

  Tytuł rozprawy doktorskiej: *Badania nad wpływem środków znieczulających miejscowo na fibroblasty skóry ludzkiej w hodowli.* Promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Korohoda.

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH

- październik 1990 – październik 1991 – doktorant, uczestnik środowiskowego studium doktoranckiego przy wydziale Biologii i Nauk o Ziemi Uniwersytetu Jagiellońskiego,
- październik 1991 – grudzień 1997 – asystent, Kraków, Uniwersytet Jagielloński, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Instytut Biologii Molekularnej,
- styczeń 1998 – grudzień 2006 – starszy specjalista naukowo-techniczny (biolog), Kraków, Uniwersytet Jagielloński Collegium Medicum, II Katedra Chorób Wewnętrznych, Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki Klinicznej,
- od grudnia 2006 – adiunkt, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Wydział Technologii Żywności, Katedra Biotechnologii Żywności.

4. OSIĄGNIĘCIE NAUKOWE STANOWIĄCE PODSTAWĘ WNIOSKU HABILITACYJNEGO

Osiągnięcie naukowe, wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2016 r. poz. 882 ze zm. W Dz. U. z 2016 r. poz. 1311.) to cykl powiązanych tematycznie sześciu publikacji dotyczących opracowania, opisania i wykorzystania nowego modelu doświadczalnego opartego na hodowli kurzych zarodkowych organoidów jelitowych.

4.1 TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

Organoidy jelitowe otrzymane z zarodków kurzych

Charakterystyka nowego modelu i jego wykorzystanie do badania wpływu probiotyków oraz ligandów receptorów Toll-podobnych na śluzówkę przewodu pokarmowego

4.2 PUBLIKACJE WCHODZĄCE W SKŁAD OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO:

Osiągnięcie habilitacyjne zostało opublikowane jako cykl powiązanych tematycznie sześciu pozycji. Cztery artykuły mają charakter doświadczalny, jeden przeglądowy. Artykuły te zamieszczono w czasopismach naukowych indeksowanych w bazie Web of Science Core Collection *(WoS)*. Jedna pozycja stanowi rozdział w książce *Organoids, Stem Cells, Structure, and Function* należącej do serii *Methods in Molecular Biology* opublikowanej przez wydawnictwo naukowe Springer-Humana Press (tekst spełnia kryteria rozdziału w monografii, jako że przekracza objętość połowy arkusza wydawniczego). W pięciu z tych publikacji jestem pierwszym autorem, w jednym ostatnim, a we wszystkich autorem korespondencyjnym.

Wchodzące w skład osiągnięcia naukowego artykuły zostały opublikowane w czasopismach mających sumaryczny współczynnik wpływu (ang. *Impact Factor*, IF) **11,941** oraz **135** punktów przyznawanych czasopismom z tzw. „listy A" przez MNiSW. Publikacje tworzące osiągnięcie habilitacyjne były cytowane według bazy *WoS* 11 razy, a wg bazy *Scopus* (która uwzględnia prace będące w druku i niewidoczne jeszcze w *WoS)* 20 razy[1].

Prace doświadczalne:

PI. Pierzchalska M., Grabacka M., Michalik M., Żyła K., Pierzchalski P. (2012) Prostaglandin E_2 supports growth of chicken embryo intestinal organoids in Matrigel matrix. *Biotechniques* 5: 07-315, DOI: 10.2144/0000113851. IF_{2012} **2,399**; pkt $MNiSW_{2012}$ **25**; praca cytowana wg *WoS* 9 razy (7 bez autocytowań); wg *Scopus* 12 razy (9 bez autocytowań).

Mój udział w pracy szacuję na 75% – byłam autorką pomysłów, jaki sposób izolacji tkanki zastosować, jak zakładać hodowlę oraz modyfikować skład pożywki. Przygotowałam samodzielnie większość hodowli, przeprowadziłam ilościową analizę obrazów mikroskopowych, wyizolowałam z organoidów białka oraz RNA, wykonałam reakcje immunoblotingu oraz przygotowałam bloczki parafinowe z zatopionymi organoidami. Napisałam także szkic, a następnie ostateczną wersję manuskryptu oraz opracowałam dane przedstawione na rycinach 1-3. Eksperymenty opisane w pracy były finansowane w większości z projektu badawczego MNiSW nr N302 130834, którego byłam kierownikiem.

[1] Dane pobrane z baz 21.11.2018

PII. Pierzchalska M., Panek M., Czyrnek M., Grabacka M. (2016) The three-dimensional culture of epithelial organoids derived from embryonic chicken intestine. W: Turksen, K. (red.) *Organoids, Stem Cells, Structure, and Function*, seria wydawnicza *Methods in Molecular Biology*, tom 1576 (Humana Press, Clifton, New Jersey, USA), DOI: 10.1007/7651_2016_15. (rozdział w monografii, wersja elektroniczna dostępna od 28.10.2016, przewidywane wydanie książki – rok 2019)
Pkt MNiSW **5**.

Mój udział w pracy szacuję na 70% – napisałam szkic, a następnie ostateczną wersję opublikowanego rozdziału oraz opracowałam Rycinę 1 oraz 5. Zdjęcia i wykresy ilustrujące opisywaną metodę powstały w większości na podstawie doświadczeń wykonanych w ramach projektu badawczego NCN 2013/09/B/NZ9/00285, którego byłam kierownikiem.

PIII. Pierzchalska M., Panek M., Czyrnek M., Gielicz A., Mickowska B., Grabacka M. (2017) Probiotic *Lactobacillus acidophilus* bacteria or synthetic TLR2 agonist boost the growth of chicken embryo intestinal organoids in cultures comprising epithelial cells and myofibroblasts. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 53: 7-18, DOI: 10.1016/j.cimid.2017.06.002.
IF_{2017} **1,92**; pkt $MNiSW_{2016}$ **25**; praca cytowana 1 raz wg *WoS*; cytowana wg *Scopus* 5 razy (4 bez autocytowań).

Mój udział w pracy szacuję na 70% – sformułowałam hipotezę badawczą i zaproponowałam schemat doświadczeń prowadzący do jej weryfikacji, brałam udział w przygotowaniu hodowli organoidów, izolacji RNA i białka z komórek, opracowałam metody barwień cytoimmunofluorescencyjnych organoidów w matriżelu, metodę izolowania z nich białka oraz RNA. Wykonywałam reakcje cytoimmunofluorescencji, zaproponowałam sposoby analizy obrazów mikroskopowych prowadzące do ilościowego opisu morfologii hodowli organoidów. Napisałam także szkic, a następnie ostateczną wersję manuskryptu oraz przygotowałam dane oraz graficzną wersję dla rycin 1-4, 5A, 7 i 12. Eksperymenty opisane w pracy były finansowane z projektu badawczego NCN 2013/09/B/NZ9/00285, którego byłam kierownikiem. W przypadku tej pracy jestem autorem korespondencyjnym.

PIV. Panek M., Grabacka M., **Pierzchalska M.** (2018) The formation of intestinal organoids in a hanging drop culture. *Cytotechnology* 70: 1085–1095, DOI: 10.1007/s10616-018-0194-8.
IF_{2017} **1,461**; pkt $MNiSW_{2016}$ **20**; praca jeszcze niecytowana wg *WoS*; cytowana wg *Scopus* 2 razy (1 bez autocytowań).

Mój udział w pracy wynosi około 30% – polegał on na zaproponowaniu zastosowania metody hodowli w wiszącej kropli do hodowli organoidów, dobraniu odpowiednich metod badawczych, przygotowaniu planu

doświadczeń i kierowaniu wykonaniem większości z nich. Eksperymenty opisane w pracy były finansowane z projektu badawczego NCN 2013/09/B/NZ9/00285, którego byłam kierownikiem. Opracowałam także ostateczną wersję manuskryptu. W pracy jestem autorem korespondencyjnym.

PV. Pierzchalska M., Panek M., Grabacka M. (2018) The migration and fusion events related to ROCK activity strongly influence the morphology of chicken embryo intestinal organoids. *Protoplasma* DOI: 10.1007/s00709-018-1312-3 (praca w druku).
IF_{2017} **2,457**; pkt $MNiSW_{2016}$ **30**; praca jeszcze niecytowana.

Mój udział w pracy szacuję na 90% – polegał on na wykonanie wstępnej obserwacji dotyczącej ruchu organoidów, nagraniu i analizie filmów poklatkowych. Napisałam także i opracowałam wstępną oraz ostateczną wersję manuskryptu i przygotowałam ryciny (z wyjątkiem ryciny 1E). Eksperymenty opisane w pracy były finansowane z projektu badawczego NCN 2013/09/B/NZ9/00285, którego byłam kierownikiem. W przypadku tej pracy jestem autorem korespondencyjnym.

Praca przeglądowa:

PVI. Pierzchalska M., Grabacka M. (2016) The potential role of some phytochemicals in recognition of mitochondrial damage-associated molecular patterns. *Mitochondrion* 30: 24-34, DOI:10.1016/j.mito. 2016.06.001.
IF_{2016} **3,704**; pkt $MNiSW_{2016}$ **30**; praca cytowana wg *WoS* 1 raz; wg *Scopus* 1 raz.

Mój udział w pracy wynosi około 75% – zaproponowałam temat i byłam twórcą ogólnej koncepcji pracy, dokonałam przeglądu piśmiennictwa dotyczącego podjętego zagadnienia i napisałam przeważającą część tekstu (około trzech czwartych), a także opracowałam ostateczną wersję pracy, będąc autorem korespondencyjnym.

4.3 Omówienie cyklu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Rośliny i zwierzęta są żyjącymi przejawami Natury.
Zatem cały Bóg jest we wszystkich rzeczach [...]
Myśl więc o Słońcu w krokusie, narcyzie, słoneczniku, ***kogucie*** *i lwie.*

Giordano Bruno „Wygnanie triumfującej bestii"[2]

4.3.1 Cel naukowy badań

Technika hodowli trójwymiarowej organoidów jelitowych od kilku lat zmienia obraz badań nad fizjologią nabłonka przewodu pokarmowego człowieka oraz innych ssaków. Metoda ta nie była jednakże stosowana dla komórek pochodzących z gatunków należących do innych gromad kręgowców. Hipoteza badawcza – postawiona przed przystąpieniem do opisywanego tutaj cyklu badań – zakładała, że również nabłonek przewodu pokarmowego kury jest tkanką, z której można otrzymać hodowlę organoidów. Celem podjętych prac było stworzenie nowego modelu hodowli trójwymiarowej i potwierdzenie jego przydatności dla badań poszerzających wiedzę o fizjologii przewodu pokarmowego ptaków na przykładzie *Gallus gallus domesticus* – gatunku modelowego w biologii, a jednocześnie mającego duże znaczenie praktyczne dla hodowli i produkcji żywności w świecie.

Na przedstawiane osiągnięcie naukowe składają się prace opublikowane w latach 2012–2018, potwierdzające, że komórki kurzego nabłonka jelitowego można hodować w formie organoidów. Do metodyki otrzymywania organoidów kurzych wprowadziłam innowacje niestosowane jak dotąd w modelach ssaczych, a także podjęłam próbę wykorzystania techniki hodowli w wiszącej kropli do hodowli organoidów jelitowych. Po opracowaniu modelu organoidów jelitowych pochodzących z zarodków kurzych celem badawczym stało się przeanalizowanie, w jaki sposób może on zostać wykorzystany w badaniach nad konkretnym zagadnieniem związanym z fizjologią jelita ptaków. Założyłam, że aktywacja receptorów Toll-podobnych (TLR – ang. *Toll-like receptors*) przez ich ligandy, a także kontakt z bakteriami probiotycznymi mogą być czynnikami modulującymi funkcjonowanie organoidów – w tym wzrost i różnicowanie komórek nabłonkowych, syntezę mediatorów zapalenia – a także mogą wpływać na dynamiczne zjawiska w hodowli, takie jak ruch, fuzja i wzrost organoidów.

4.3.2 Główne przesłanki dla podjęcia badań

Opracowanie metody hodowli nabłonka jelitowego kury

Metoda hodowli *in vitro* pozwala na utrzymywanie przy życiu komórek zwierząt poza organizmem. Narzędzie to, choć używane przez biologów od ponad wieku, cały czas podlega udoskonalaniu. Trudno dziś przecenić wkład hodowli

[2] G. Bruno (2005) The Expulsion of the Triumphant Beast, przeł. A. D. Imerti, Lincoln: University of Nebraska Press. Tłumaczenie z angielskiego i wyróżnienie moje – M.P.

komórkowych i tkankowych w rozwój nauk biomedycznych, a nowe pomysły, w jaki sposób hodować komórki, wciąż skutkują powstaniem kolejnych modeli, przydatnych zarówno w badaniach naukowych, jak i w biotechnologii oraz terapii, a także w naukach stosowanych, takich jak farmakologia, transplantologia, nauka o żywności, weterynaria czy kosmetologia. Wyjątkowo dynamicznie rozwija się ostatnio technika hodowli organotypowych, trójwymiarowych, gdzie komórki nie są przyczepione do sztywnych płaskich powierzchni szkła lub plastiku, ale tworzą struktury przestrzenne wewnątrz syntetycznych lub naturalnych żeli o określonej grubości i sztywności albo utrzymywane są na trójwymiarowych nośnikach czy też sformowane dzięki sile grawitacji w niewielkiej porcji pożywki, w tzw. wiszącej kropli (Mazzoleni i wsp. 2009). Panujące w tych hodowlach specyficzne warunki determinowane są przez trójwymiarowość mikrośrodowiska. Inna jest w nich, w porównaniu do hodowli dwuwymiarowych w postaci monowarstw na szkle lub plastiku, dostępność tlenu, składników odżywczych i wzrostowych czynników autokrynnych. Wagę nowej techniki dla rozwoju nauk biomedycznych dostrzegła ostatnio redakcja czasopisma *Nature*, ogłaszając hodowlę organoidów metodą roku 2017 (Kalabusheva i wsp. 2018). Komórki nabłonkowe prawidłowe tworzą w hodowli trójwymiarowej zwarte zespoły o kształcie sfer, nazywane sferoidami, a komórki nowotworowe formują niewielkie kuliste twory określane mianem mikroguzów. Hodowla trójwymiarowa ma szczególnie duże znaczenie w badaniach nad biologią komórek pochodzących ze śluzówek przewodu pokarmowego.

Nabłonek jelitowy ssaków i ptaków to nabłonek jednowarstwowy, w którym u osobników dojrzałych podziały komórkowe zachodzą jedynie we wgłębieniach zwanych kryptami Lieberkühna. Krypty jelitowe stanowią nisze dla nielicznych komórek macierzystych oraz zawierają powstające z nich progenitory wszystkich typów komórek nabłonka jelitowego, a także zróżnicowane komórki wydzielnicze ważne dla wrodzonej odporności i homeostazy krypt, zwane komórkami Panetha. Obszar rąbka szczoteczkowego utworzony jest przez zwrócone do światła jelita milimetrowe wypustki, czyli kosmki. Komórki progenitorowe migrują w górę krypt aż do podstawy kosmków, która jest miejscem różnicowania progenitorów do funkcjonalnych komórek wchłaniających, enterocytów, i komórek enteroendokrynnych oraz kubkowych – produkujących, odpowiednio, hormony i śluz. Następnie komórki przesuwają się w stronę szczytów kosmków, gdzie ulegają apoptozie i złuszczeniu do światła jelita. Zużyte komórki nabłonkowe są ciągle zastępowane przez nowe. Istnienie w trójwymiarowej przestrzeni ściany jelita funkcjonalnej osi różnicowania od krypty do kosmka determinuje prawidłowe działanie nabłonka jelitowego jako organu służącego do wchłaniania składników odżywczych i pełniącego funkcję odpowiedzi immunologicznej oraz bariery dla zawartych w pożywieniu substancji i mikroorganizmów (Chin i wsp. 2016). Ta unikalna organizacja sprawia, że dla utrzymania komórek nabłonka jelitowego w hodowli konieczne jest zapewnienie odpowiednich czynników nie tylko biochemicznych (to jest

obecności w pożywce hodowlanej właściwych czynników wzrostowych i morfogenów), ale też biofizycznych (jak na przykład odpowiednia sztywność żelu, w którym komórki są zanurzone). Fakt ten powoduje, że utrzymanie nietransformowanych nowotworowo komórek nabłonkowych pochodzących z jelita w postaci monowarstwy w tradycyjnych hodowlach na stałym podłożu napotykało długo na nieprzezwyciężalne trudności.

Przełomowe znaczenie dla rozwoju techniki hodowli nabłonka jelitowego miał pomysł Toshiro Sato i wsp., aby zanurzyć izolowane krypty jelitowe myszy lub uwolnione z nich komórki macierzyste, w których ekspresji ulega receptor R-spondyny-1 (RSPO1) o nazwie Lgr5, w środowisku białkowym przeznaczonym do hodowli trójwymiarowej, noszącym nazwę matriżel (ang. *Matrigel*®). Matriżel to mieszanina białek błony podstawnej stanowiąca dobre rusztowanie dla trójwymiarowej hodowli komórkowej. Jest to produkt pozyskiwany z mięsaka mysiego Engelbretha-Holma-Swarma (EHS) zawierający głównie lamininę, kolagen IV i entaktynę, bogaty w czynniki wzrostowe. W przypadku gdy pożywka miała odpowiedni skład – zawierała między innymi RSPO1, nogginę oraz naskórkowy czynniki wzrostowy (EGF) – po kilku dniach hodowli obserwowano powstawanie pustych w środku sferoidów, których powierzchnię tworzyły ściśle do siebie przylegające komórki nabłonkowe. W kolejnym etapie dochodziło do powstania na powierzchni sferoidów wypustek – obszarów zagłębiających się w macierzy, gdzie zachodziły podziały komórkowe. Są to obszary morfologicznie podobne do krypt (Sato i wsp. 2009, Sato and Clevers 2013). Tym samym sferoidy przekształcały się w tak zwane enteroidy. Enteroidy, posiadające obszary zawierające komórki zróżnicowane i obszary odpowiadające kryptom, oraz sferoidy, zbudowane z komórek niezróżnicowanych, pozyskiwano również z jelita embrionów mysich (Mustata i wsp. 2013). Wkrótce potem podobne procedury ustalono dla hodowli ludzkich organoidów pochodzących z jelita cienkiego, grubego oraz zmienionego nowotworowo. W wyniku różnicowania *in vitro* zarodkowych komórek macierzystych lub indukowanych pluripotencjalnych komórek macierzystych (iPSC – ang. *induced pluripotent stem cells*) można wytworzyć struktury o typie organoidów (iHIOs- ang. *induced human intestinal organoids*) – zawierające oprócz komórek nabłonkowych także komórki mezenchymalne (Finkbeiner i Spence 2013), odpowiadające jednak bardziej tkance zarodkowej niż dojrzałej śluzówce jelita cienkiego (Wells i Spence 2014). Takie i podobne hodowle tkankowe zostały ostatnio wykorzystane w rozmaitych badaniach, na przykład nad regeneracją jelita, nowotworzeniem, metabolizmem komórkowym oraz wpływem kontaktu z patogenami i komensalami na fizjologię śluzówki jelitowej (Finkbeiner i wsp. 2012, Zhang i wsp. 2014, Karve i wsp. 2017, In i wsp. 2016).

Kura domowa jest dla biologii jednym z ważniejszym organizmów modelowych (Stern 2005), a jej genom został zsekwencjonowany jako jeden z pierwszych genomów zwierzęcych (Hillier i wsp. 2004). Na uwagę zasługuje fakt, że na Ziemi żyje obecnie ponad 20 miliardów kur (trzy ptaki tego gatunku

przypadają na jednego człowieka), roczna światowa produkcja drobiowego mięsa wynosi ponad 100 milionów ton, zaś kurzych jaj wytwarza się i sprzedaje około 70 milionów ton (Mottet i Tempio 2017). Zainteresowanie nauki biologią gatunku *Gallus gallus domesticus* wykracza więc poza traktowanie kury domowej jako organizmu modelowego w badaniach nad rozwojem zarodkowym czy immunologią, a wiąże się również z wielkim znaczeniem hodowli drobiu dla wyżywienia ludzkości i gospodarki. Warto o tym pamiętać szczególnie w Polsce, która jako kraj produkujący ponad 2 miliony ton mięsa drobiowego – z czego niemal połowa przeznaczana jest na eksport – jest liderem tej branży w Unii Europejskiej (dane Eurostat z 2017 roku, źródło elektroniczne 1).

Duże różnice w rozwoju przewodu pokarmowego ptaków i ssaków sprawiają, że metody hodowli organoidów zaproponowane dla gryzoni i człowieka nie muszą się koniecznie sprawdzać w przypadku kur. Kurczaki, będąc typowymi zagniazdownikami, rodzą się z dojrzałym przewodem pokarmowym, a do zasiedlenia dróg pokarmowych przez bakterie dochodzi już w jaju, pod koniec rozwoju zarodkowego (Trevelline i wsp. 2018). Proliferacja komórek nabłonka jelitowego kurcząt po wykluciu nie ogranicza się do słabo wytworzonych krypt, a zachodzi również w obszarze nabłonka pokrywającego kosmki (Roto i wsp. 2016). Biorąc pod uwagę powyższe fakty, opracowanie metody hodowli trójwymiarowej komórek nabłonka jelitowego kury uznałam za ważne i nietrywialne wyzwanie badawcze.

Następnie moim celem stało się wszechstronne porównanie modelu kurzych organoidów jelitowych z odpowiadającymi modelami ssaczymi. W badaniach nad opracowaniem metody i charakterystyką modelu brałam pod uwagę pochodzenie organoidów (z fragmentów nabłonka jelita zarodków *versus* z krypt izolowanych z dojrzałego nabłonka), sposób tworzenia trójwymiarowej hodowli (warstwa matriżelu na porowatej membranie insertów lub na powierzchni naczynia hodowlanego *versus* hodowla w 5% matriżelu w formie „wiszącej kropli") oraz skład pożywki (np. dodatek lub brak prostaglandyny E_2 – PGE_2).

Rola probiotyków i ligandów TLR w homeostazie śluzówki jelit

Wpływ mikrobiomu jelitowego na fizjologię jelita i odporność nieswoistą organizmu w przypadku zarówno ludzi, jak i zwierząt gospodarskich sugerowany jest przez wiele badań klinicznych i żywieniowych (Lutful Kabir 2009). Rola komensalnych mikroorganizmów jako ważnego elementu homeostazy nabłonka dróg pokarmowych kręgowców jest obecnie przedmiotem intensywnych badań. Uważa się również, że symbiotyczna flora jelit może mieć wpływ na odporność całego organizmu (Pott i Hornef 2012), a jej zmiany są prawdopodobnym elementem patogenezy różnych chorób układowych o podłożu infekcyjnym lub autoimmunologicznym, a nawet nowotworowym (Sommer i Bäckhed 2013). Probiotyki od zawsze były traktowane jako ważny składnik żywności i pasz o potencjale prozdrowotnym,

a obecnie są coraz częściej proponowane jako dodatkowy składnik różnych terapii w medycynie (Markowiak i Śliżewska 2017) i weterynarii (Markowiak i Śliżewska 2018). Mechanizm działania probiotyków nie jest w wielu przypadkach wyjaśniony, ale fakt, że są one potencjalnym źródłem różnorodnych ligandów dla receptorów typu TLR, może być ważnym elementem sprzyjającym utrzymaniu homeostazy. Takie ligandy nie tylko stymulują mechanizmy obronne w śluzówkach i poza nimi, ale także mogą wpływać na proliferację i różnicowanie komórek je budujących, w tym komórek nabłonka jelitowego (Abreu 2010).

Przesłanki doświadczalne i epidemiologiczne wskazują, że zaburzenie interakcji między mikrobiomem a komórkami gospodarza przyczynia się do niektórych chorób ludzi – na przykład choroby Leśniewskiego-Crohna, wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (Round i Mazmanian 2009), martwiczego zapalenia jelit noworodków (Ganguli i wsp. 2013) – i zwierząt – na przykład martwiczego zapalenia jelit kur (Jayaraman i wsp. 2013). Dobór odpowiednich szczepów bakterii probiotycznych i sposób oraz celowość ich wykorzystania w profilaktyce i leczeniu stanów zapalnych o różnej etiologii (zakaźnej lub autoimmunologicznej) wciąż jest jednak przedmiotem intensywnej debaty. Zagadnienie to ma szczególną wagę w przypadku hodowli drobiu. Zgromadzenie dużej liczby osobników na małej przestrzeni, brak kontaktu jaj i wylęgających się piskląt z matką (a tym samym z jej florą bakteryjną), związany z przemysłową hodowlą fakt krótkotrwałego głodzenia piskląt po wykluciu – wszystko to wpływa negatywnie na wzrost i rozwój prawidłowej odporności ptaków i zwiększa możliwość szerzenia się w stadach niebezpiecznych infekcji skutkujących stratami finansowymi i zagrożeniem zdrowia konsumentów. W oparciu o te przesłanki zaplanowałam doświadczenia z wykorzystaniem modelu organoidów jelitowych hodowanych w obecności żywych bakterii probiotycznego szczepu *Lactobacillus acidophilus* LA5 w nadziei, że przyczyni się to do poznania skomplikowanych zależności między mikrobiomem jelitowym a śluzówką przewodu pokarmowego.

Zwierzęta rozpoznają patogeny i bakterie komensalane oraz reagują na ich obecność ponieważ posiadają na powierzchni komórek receptory rozpoznające tak zwane wzorce molekularne mikroorganizmów (MAMPs – ang. *microorganisms-associated molecular patterns*). Jedną z najważniejszych grup tego typu białek są ewolucyjnie konserwatywne receptory TLR, homologiczne z białkiem Toll muszki owocowej, *Drosophila melanogaster*. Receptory te wiążą ligandy będące częścią mikroorganizmów, ale także takie, które pochodzą z wnętrza organizmu, pojawiające się w wyniku uszkodzenia tkanek i komórek (ang. *DAMPs – damage-associated molecular patterns*) (Yu i wsp. 2010). Białka TLR odgrywają ważną rolę w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej kręgowców, ale najprawdopodobniej ewolucyjnie pierwotna funkcja TLR związana jest z regulacją różnicowania komórek, homeostazą tkanek i rozwojem (Rakoff-Nahoum i Medzhitov 2008). U ssaków ekspresja receptorów Toll-podobnych jest niska w dojrzałych enterocytach osobników

dorosłych, natomiast wysoka w komórkach nabłonkowych noworodków i w komórkach krypt. Wydaje się, że komórki nabłonka przewodu pokarmowego są pobudzane jedynie przez wzorce molekularne mikroorganizmów, które przedostały się przez nabłonek w wyniku aktywnego transportu lub uszkodzenia. Jest to istotą zjawiska tolerancji immunologicznej, charakteryzującej zdrowy nabłonek, w którym nie rozwija się zapalenie, mimo zasiedlenia jelit przez liczne komensalne mikroorganizmy. Pokazano, że aktywacja jednego z TLR występującego w nabłonku jelitowym myszy, TLR2, gdy już do niej dojdzie, skutkuje zależną od czynnika jądrowego κB (ang. *nuclear factor-κB,* NF-κB) nadeksprsją enzymu cyklooksygenazy-2 (COX-2), co zwiększa sekrecję PGE_2 i przyśpiesza podziały komórek i, tym samym, sprzyja procesowi regeneracji nabłonka jelitowego (Ciorba i wsp. 2012). Z drugiej strony w modelu enteroidów myszy i *in vivo* aktywacja TLR4 komórek macierzystych krypt przez lipopolisacharyd (LPS) hamuje proliferację i aktywuje apoptozę, zależnie od białka regulatorowego PUMA (ang. *p53 upregulated modulator of apoptosis*), (Neal i wsp. 2012). Wydaje się, że u ssaków skutek aktywacji TLR w komórkach nabłonkowych jelit zależy od rodzaju receptora, miejsca zadziałania sygnału (apikalnie lub bazolateralnie) oraz stopnia zróżnicowania komórek poddawanych działaniu ligandów. Do różnic w funkcjonowaniu nabłonka jelitowego ptaków i ssaków, na które do tej pory wskazywano, należą: zdolność do podziałów komórek poza dnem krypt jelitowych u młodych ptaków oraz powinowactwo poszczególnych receptorów Toll-podobnych występujących w błonie komórek nabłonkowych do innych ligandów.

Nie wiadomo, jakie mechanizmy regulują aktywację TLR w przewodzie pokarmowym kury i czy różnią się one od tych obserwowanych u innych organizmów doświadczalnych. Mając na uwadze powyższe pytania, podjęłam próbę oceny w modelu organoidów kurzych wpływu stymulacji lipopolisacharydem z *Escherichia coli* (wiązanym przez TLR4) i syntetycznym trójpalmitylowanym lipopeptydem (P3CSK4, wiązanym przez TLR2) na fizjologię budujących organoidy komórek nabłonkowych i mezenchymalnych. Prace te stanowią także przykład zastosowania uprzednio opracowanego modelu doświadczalnego w celu badania konkretnego aspektu fizjologii śluzówki jelitowej.

4.3.3 Omówienie głównych wyników cyklu prac stanowiących podstawę osiągnięcia habilitacyjnego

Opracowanie metody hodowli organoidów z jelita zarodków kurzych

Pierwsza praca należąca do omawianego cyklu powstała w trakcie realizacji projektu badawczego, którego byłam kierownikiem, zatytułowanego *Model zróżnicowanego nabłonka jelita kurzego in vitro jako narzędzie do oceny immunomodulacyjnej roli śluzówki przewodu pokarmowego* (2008-2011, projekt badawczy MNiSW nr N302 130834). Jednym z założeń tego projektu było przygotowanie efektywnej metody hodowli nabłonka jelitowego kur.

Pierwsze moje próby koncentrowały się na opracowaniu wydajnej izolacji komórek nabłonka poprzez inkubację fragmentów jelita pochodzącego z zarodków kurzych między osiemnastym a dwudziestym dniem rozwoju w obecności zbuforowanych roztworów zawierających chelator jonów wapnia przez określony czas (0,5–2 godziny). Dążyliśmy też do ustalenia właściwego podłoża do wysiania otrzymanych fragmentów nabłonka oraz przetestowania składników pożywek umożliwiających proliferację komórek nabłonkowych poprzez jak najdłuższy czas po izolacji.

W czasie, gdy realizowaliśmy projekt, grupa badawcza z Uniwersytetu w Utrechcie pokazała, że nabłonek jelitowy myszy można hodować w warstwie matriżelu w postaci trójwymiarowych struktur zwanych enteroidami lub organoidami jelitowymi (Sato i wsp. 2009). W oparciu o metodykę opisaną przez tych autorów oraz własne dotychczasowe doświadczenia spróbowałam z powodzeniem założyć i prowadzić długotrwałą hodowlę komórek nabłonkowych pochodzących z jelita cienkiego osiemnastodniowych zarodków kurzych. Do procedury wprowadziłam jednak istotne modyfikacje, udowadniając, że organoidy kurze można otrzymać również w pożywce niezawierającej dwóch czynników – nogginy (antagonisty białka morfotycznego kości, BMP) i RSPO1 (liganda receptora Lgr5 będącego markerem komórek macierzystych krypt i aktywatorem przekazu sygnału ścieżki WNT) – niezbędnych dla hodowli organoidów jelitowych myszy, jeśli doda się do niej PGE_2. Wyniki te stały się podstawą publikacji, która opisuje metodę hodowli organoidów pochodzących z jelitowego nabłonka zarodków kurzych *(zob. PI)*. Okazało się, że – podobnie do organoidów mysich opisywanych przez Sato i współpracowników – organoidy kurze zawierają zróżnicowane enterocyty, jako że białko z nich izolowane przejawia aktywność enzymatyczną charakterystyczną dla jednego z markerów absorpcyjnego nabłonka kosmków, sacharazo-izomaltazy. Wykazaliśmy także obecności transkryptów dla genów *cdxA i cdxB*, przy czym wyższa ekspresja *cdxA* charakteryzowała organoidy hodowane w obecności RSPO1 i nogginy w porównaniu do organoidów hodowanych w pożywce niezawierającej ani jednego, ani drugiego czynnika. Podobny efekt uzyskałam, dodając do hodowli PGE_2. Był to ważny wynik z punktu widzenia ustalenia charakteru otrzymanych struktur, gdyż ptasi gen *cdxA* jest uważany za odpowiednik genu homeotycznego *cdx2* ssaków *(*ang. *caudal-related homeodomain protein 2),* będącego głównym identyfikatorem linii komórek endodermalnych tworzących w rozwoju zarodkowym pierwotne jelito. Warunkowa delecja tego genu w nabłonku jelitowym zarodków myszy (d13.5) blokuje ekspresję białek markerowych komórek nabłonka jelitowego i w takich transgenicznych zarodkach normalna struktura jelit nie może się wykształcić (Grainger i wsp. 2013, Chin i wsp. 2016).

Metodą immunoblotingu wykazaliśmy również obecność w organoidach cytokeratyny (markera nabłonków) oraz wiliny (białka mikrokosmków występującego zarówno w progenitorach, jak i w funkcjonalnych

enterocytach). Histologiczne barwienie organoidów pokazało, że są to sfery pokryte jednowarstwowym nabłonkiem, a w ich wypełnionym płynem wnętrzu znajdują się jedynie resztki martwych komórek. Długotrwała obserwacja organoidów pozwoliła na potwierdzenie, że pozostają one żywe w trakcie ponad miesięcznej hodowli.

Po ukazaniu się naszej pracy w czasopiśmie „Biotechniques" otrzymałam zaproszenie do napisania rozdziału stanowiącego część tomu *Organoids, Stem Cells, Structure, and Function* wydanego w ramach serii „Methods in Molecular Biology". Stworzyło to okazję do opublikowania bardzo szczegółowego protokołu zakładania i prowadzenia hodowli organoidów pochodzących z kurzych zarodków i z jelita dorosłych kur *(zob. PII)*. W tej publikacji przedstawiłam również dokładny opis otrzymanych w warstwie matriżelu trójwymiarowych struktur złożonych z komórek, które mogą mieć charakter zarówno sferoidów, jak i tworzyć długie i rozgałęzione rurki, szczególnie jeśli wysiewane są w odpowiednio dużej gęstości. W publikacji podkreślono także obecność w hodowli organoidów komórek o charakterze miofibroblastów. W organoidach pochodzących z tkanki zarodkowej komórki mezenchymalne przylegają do ścian sferoidów, co pozwala przypuszczać, że miofibroblasty wraz z komórkami nabłonkowymi stanowią spójną jednostkę strukturalną. Im dłużej organoidy są hodowane, tym więcej miofibroblastów pojawia się w ich obrębie, co potwierdza zarówno obserwacja morfologii organoidów, jak i deformacja (kurczenie się) żelu, w którym organoidy są zanurzone. Ilość markera miofibroblastów (izoformy aktyny α mięśni gładkich – αSMA) w hodowli również rośnie w czasie, jak wykazano metodą imunoblotingu białka całkowitego izolowanego z hodowli dwu- i siedmiodniowej *(zob. PIII)*.

Fakt, że dwa typy komórek wzajemnie na siebie oddziałują, może sprzyjać witalności otrzymanych hodowli. Podobną metodę zastosowali inni autorzy w przypadku organoidów pochodzących z noworodków mysich, gdzie struktury nabłonkowe z obecnymi komórkami macierzystymi tworzyły się w warstwie kolagenu w bliskim sąsiedztwie proliferujących miofibroblastów (Ootani i wsp. 2009, Lahar i wsp. 2011). Natomiast, jak sprawdziłam, w przypadku organoidów pochodzących z jelita dorosłych kur miofibroblastów jest bardzo mało. W opublikowanym rozdziale monografii uwzględniłam też wyniki ilościowe pochodzące z porównania pod względem morfologicznym hodowli utrzymywanych w pożywkach o różnym składzie. Okazało się, że obecność kurzej surowicy w stężeniu nieprzekraczającym jednoprocentowego może sprzyjać proliferacji komórek nabłonkowych i wzrostowi organoidów (w przeciwieństwie do płodowej surowicy cielęcej, której podobny dodatek hamuje wzrost organoidów, *zob. PII)*. Wynik ten, jak można przypuszczać, związany jest ze stymulującym wpływem czynników występujących w surowicy kurzej, które mogą być gatunkowo specyficzne.

Badania nad wpływem niektórych ligandów TLR i bakterii probiotycznych na organoidy jelitowe w hodowli

Zbadanie wpływu niektórych ligandów TLR, a także bakterii probiotycznych na organoidy w hodowli było jednym z celów badawczych kolejnego projektu grantowego finansowanego ze środków NCN w ramach programu OPUS, którym kierowałam w latach 2014-2017 (*Wpływ bakterii probiotycznych oraz ligandów receptorów Toll-podobnych na wzrost i różnicowanie komórek nabłonkowych jelita cienkiego – badania w modelu organotypowej hodowli trójwymiarowej pochodzącej z zarodków kurzych*, 2013/09/B/NZ9/00285). Rozpoczynając prace w ramach tego projektu, wykonaliśmy wraz z moim zespołem serię badań wstępnych w celu ustalenia najoptymalniejszego sposobu dodawania badanych związków do hodowli oraz ich stężenia. Zdecydowaliśmy się dodawać ligandy TLR, to jest lipopeptyd (Pam_3CSK_4) i lipopolisacharyd (wysokooczyszczony LPS z patogennego szczepu *Escherichia coli* O111:B4) do hodowli w momencie łączenia zawiesiny komórek i fragmentów tkanki z matriżelem (czas 0). Równocześnie ten sam czynnik dodawany był do pożywki hodowlanej. Taki schemat doświadczenia pozwolił na założenie, że ligandy dostają się do wnętrza tworzących się sfer. Zostało to następnie potwierdzone przez badania pokazujące lokalizację znakowanych fluorescencyjnie ligandów wewnątrz powstających struktur (dane niepublikowane). Równolegle prowadziliśmy badania nad wspólną hodowlą zawierającą oprócz organoidów jelitowych bakterie probiotycznego szczepu z gatunku *Lactobacillus acidophilus*. Żywe bakterie dodawane były do hodowli również w chwili jej założenia, a ich obecność potwierdzono we wewnętrzu organoidów. Stosując powyższą metodę, opisałam następujące zjawiska:

1. Syntetyczny ligand receptora TLR2 (lipopeptyd, Pam_3CSK_4) użyty w stężeniu 2 μg/ml stymuluje wzrost organoidów, co przejawia się zarówno we wzmożonej proliferacji komórek nabłonkowych, jak i w zwiększeniu parametrów opisujących wielkość i ilość organoidów w hodowli. Dodatkowo zaobserwowałam, że zjawisku temu towarzyszy wzmożona produkcja prostaglandyn przez komórki w hodowli organotypowej oraz zwiększona ekspresja receptorów TLR2.1 i TLR4 *(zob. PIII)*. Ligand receptora TLR4 – lipopolisacharyd (LPS, z *Escherichia coli* O111:B4) – stymulował również w niewielkim stopniu wzrost organoidów, gdyż po trzech dniach hodowli organoidy powstające w obecności LPS w stężeniu 1 μg/ml miały średnicę istotnie większą od organoidów w hodowlach bez tego czynnika *(zob. PIII i PV)*.

2. Wspólna hodowla organoidów z żywymi bakteriami probiotycznymi (*Lactobacillus acidophilus* LA5) pobudza wzrost organoidów hodowanych w matriżelu. W warunkach wspólnej hodowli z probiotykami wzrasta w komórkach organoidów ekspresja mRNA dla TLR2.1 *(zob. PIII)*.

Kluczowa rola PGE_2 w podtrzymywaniu aktywności szlaku WNT poprzez fosforylację β-kateniny jest dobrze potwierdzona (Goessling i wsp. 2009),

a dodanie tego prostanoidu do pożywki hodowlanej sprzyja reprogramowaniu komórek nabłonkowych w kierunku regeneracji (Miyoshi i wsp. 2017), a także, jak wykazałam, stymuluje wzrost kurzych organoidów jelitowych w matriżelu. Nikt do tej pory nie oceniał profilu produkcji prostaglandyn przez organoidy jelitowe niezależnie od ich pochodzenia gatunkowego. Postanowiłam więc zmierzyć, jakie prostaglandyny i w jakich stężeniach obecne są w nadsączach znad hodowli organoidów, a także znad monohodowli zarodkowych jelitowych kurzych fibroblastów. Okazało się, że organoidy produkują znaczące ilości PGE_2, ale w nadsączach obecna była również PGD_2 w porównywalnym stężeniu, przy czym sekrecja tej prostaglandyny rosła z czasem (było jej więcej w nadsączach pobranych między drugim a czwartym dniem, w porównaniu z nadsączami z pierwszych dwu dni hodowli). Stwierdziłam również obecności w warunkowanych pożywkach produktów enzymatycznej konwersji obu badanych prostaglandyn (13,14-dihydro-15-keto PGE_2; 13,14-dihydro-15-keto PGD_2) oraz obecność PGA_2, produktu nieenzymatycznej transformacji PGE_2. Miofibroblasty produkowały dziesięć razy więcej PGD_2 w stosunku do PGE_2, przy czym stężenie produktów enzymatycznego rozkładu obu prostaglandyn było w nadsączach z fibroblastów znikome. Wzrost ilości PGD_2 w starszych hodowlach może więc być wprost zależny od obecności większej liczby miofibroblastów. Obecność Pam_3CSK_4 w pożywce powodowała wzrost syntezy obu badanych prostaglandyn, co może się wiązać ze stymulującym działaniem tego liganda na wzrost organoidów i podtrzymanie proliferacji komórek nabłonkowych w ich obrębie *(zob. PIII)*.

Organoidy jelitowe w „wiszącej kropli"

Kolejna praca *(PIV)* jest wynikiem innego podejścia do hodowli organoidów. Postanowiłam sprawdzić, co się wydarzy, jeśli te same komórki, które dają początek organoidom w matriżelu umieści się w tak zwanej wiszącej kropli. Technika hodowli w kropli jest właściwie typem hodowli w zawiesinie i jedną z najstarszych metod hodowli komórkowej w ogóle, która ostatnio wzbudza ponownie coraz większe zainteresowanie. Umożliwia ona otrzymanie „mikronarządów" (Figtree i wsp. 2017, Lin i wsp. 2016) lub „mikroguzów" (Kuo i wsp. 2017, Asghar i wsp. 2015), które stają się wygodnym modelem eksperymentalnym. Okazało się, że w wiszącej kropli pożywki (50 µl) z dodatkiem jedynie 5% matriżelu organoidy jelitowe także ulegają sformowaniu po kilku dniach hodowli. W doświadczeniach tych, zamiast doprowadzać do wzrostu trójwymiarowych sfer lub rurek w otoczeniu żelu złożonego z białek macierzy pozakomórkowej, użyliśmy specjalnie przygotowanej płytki do hodowli (96-well *Perfecta3D Hanging Drop Plate* wyprodukowanej przez 3D Biomatrix, Ann Arbor MI, USA). Do płytki takiej, złożonej z mikroskopijnych lejków, można wprowadzić niewielką ilość płynu w taki sposób, że dodany do niej materiał tkankowy koncentruje się na małej przestrzeni dna kropli dzięki działającej na komórkowe agregaty sile ciężkości. Ten cykl doświadczeń stanowił jedno z zadań badawczych realizowanego przez mój zespół projektu NCN. W ramach tego zadania przeważająca część

eksperymentów została wykonana pod moim kierunkiem przez pierwszego autora pracy, mgr Małgorzatę Panek (Gawin), studentkę Studium Doktoranckiego Uniwersytetu Rolniczego im. Hugona Kołłątaja w Krakowie.

Przeprowadziłyśmy porównanie organoidów pod względem morfologii, pokazując, że struktura powstająca w wiszącej kropli to konglomerat enteroidów, których ściany zbudowane są z komórek nabłonkowych o większym stopniu zróżnicowania niż w przypadku organoidów w matriżelu. Badałyśmy także obecności transkryptów niektórych markerowych genów (metodą RT-PCR) i białek (metodą immunoblotingu). Jeśli chodzi o białka zróżnicowanych enterocytów (sacharazo-izomaltaza), komórek macierzystych (Lgr5) i proliferujących (PCNA), nie wykazałyśmy znaczących różnic między dwoma sposobami hodowli. W hodowli w wiszącej kropli nie obserwowałyśmy jednak miofibroblastów, a białka będącego ich markerem (α-SMA) nie wykrywałyśmy metodą immunoblotingu w lizatach białkowych otrzymanych z tworzących się w takich warunkach agregatów złożonych z organoidów. Do najważniejszych zalet zastosowania techniki hodowli w wiszącej kropli do tworzenia organoidów jelitowych należy zaliczyć zmniejszone zużycie matriżelu i pożywki, co skutkuje ograniczeniem kosztów eksperymentów, a także możliwość badania wielu warunków doświadczalnych lub wykonywania wielu powtórzeń eksperymentu jednocześnie. Jako wadę należy potraktować pracochłonność wymiany pożywki i trudności w ocenie morfologii organoidów w czasie obserwacji mikroskopowej, a także konieczność zastosowania zaprojektowanych i produkowanych dla hodowli wiszących płytek wielodołkowych. Przydatność nowej metody w konkretnych sytuacjach badawczych zostanie zapewne zweryfikowana w przyszłości.

Dynamiczne właściwości organoidów

W kolejnej pracy wchodzącej w skład omawianego cyklu zajęłam się cechą organoidów jelitowych często pomijaną przez innych uczonych, którzy wykorzystują ten i podobne modele w swoich badaniach – ich dynamiką, zdolnością do ruchu i migracji *(zob. PV)*. Jak dotąd jedynie nieliczne publikowane badania podejmują marginalnie temat dynamicznej natury organoidów jelitowych, wskazując na ich możliwą fuzję (Jabaji i wsp. 2014, Sachs i wsp. 2017) i rotację (Viktorinová i wsp. 2017), natomiast nikt wcześniej nie analizował ich kierunkowej migracji. Stało się to możliwe dzięki użyciu metod poklatkowej rejestracji obrazów i ich cyfrowej analizy. Istotną częścią pracy są cztery filmy dostępne jedynie w wersji elektronicznej publikacji w postaci plików w formacie avi *(zob. PV, supplementary materials)*. Hodowlę organoidów umieszczano w komorze zamontowanej na stoliku mikroskopu odwróconego (Zeiss Axiovert Z1), wyposażonej w moduły regulacji temperatury (37°C) i poziomu dwutlenku węgla (5%), zapewniając im warunki podobne do tych, jakie panują w inkubatorze. Na filmach rejestrujących pierwsze cztery dni hodowli (jedna klatka filmu odpowiada jednemu zdjęciu spod mikroskopu wykonywanemu co pół godziny) widać proces formowania się sfer, które tworzą się z fragmentów nabłonka o średnicy kilkudziesięciu mikrometrów. Zjawisko

to ma najczęściej miejsce w pierwszych dwunastu godzinach od początku izolacji. Wewnątrz fragmentu nabłonka wykształca się przestrzeń wypełniona płynem, a ścianę sfery tworzą ściśle do siebie przylegające komórki nabłonkowe. W drugiej dobie hodowli wzrasta ilość miofibroblastów, których aktywność skurczowa zdaje się mieć wpływ na morfologię organoidów oraz przebudowywać otaczającą je macierz. Z czasem fragmenty martwych komórek wypełniają wnętrze organoidów i niekiedy dochodzi do ich pękania.

Zaskakującym zjawiskiem ujawnionym w czasie analizy filmów był fakt, że duża część organoidów aktywnie się porusza. Organoidy o morfologii zbliżonej do sfer intensywnie rotują, niekiedy zmieniając kierunek rotacji. Organoidy o kształtach bardziej nieregularnych są zdolne do przemieszczania się w warstwie matriżelu z prędkością około 300 mikrometrów na dzień, w czasie ruchu zmieniają swój kształt na bardziej wydłużony. Na skutek wzrostu i przemieszczania poprzez żel złożony z białek macierzy zewnątrzkomórkowej sąsiadujące ze sobą organoidy „wpadają na siebie" i ulegają fuzji.

W dyskusji podkreślam, że ruch organoidów można traktować jako przykład ruchu zespołowego komórek (ang. *collective cell movement*) i że zbadanie mechanizmu przemieszczania się organoidów wymaga dalszych badań. Krokiem w tym kierunku było sprawdzenie, czy hamowanie kinaz białkowych związanych z Rho (ang. *Rho-associated coiled coil-containing protein kinases,* ROCK) poprzez dodatek do pożywki hodowlanej specyficznego inhibitora, Y27632, hamuje aktywność ruchową organoidów. Jak pokazaliśmy, gdy szlak przekazu sygnału związany z małymi białkami Rho jest hamowany, tworzą się hodowle zawierające dużą ilość drobnych organoidów. Jak wynika z analizy filmów, dzieje się tak prawdopodobnie w wyniku zmniejszenia częstości fuzji między tworzącymi się organoidami. Przy tym zjawisko to obserwowaliśmy zarówno w hodowlach stymulowanych do wzrostu przez dodatek LPS, jak i bez obecności tego liganda TLR4. Jak sądzę, wyniki przedstawione przeze mnie wyraźnie sugerują, że dynamiczne procesy fuzji i ruchu nie powinny być pomijane, gdy organoidy są stosowane jako model w badaniach fizjologii śluzówki jelit.

4.3.4 Omówienie potencjalnego wykorzystania wyników prac wchodzących w skład osiągnięcia naukowego

Wyniki doświadczeń będące istotą przedstawianego osiągnięcia habilitacyjnego wpisują się w ogólnoświatowy trend w badaniach biomedycznych, polegający na zastępowaniu eksperymentów prowadzonych w hodowlach komórkowych typu 2D badaniami wykorzystującymi hodowle 3D. Jeśli w hodowli trójwymiarowej dochodzi do tworzenia struktur zwanych „miniorganami" lub „miniguzami", to komórki przebywają w warunkach zbliżonych do tych, które panują w tkance *in vivo*. Wpisanie haseł „intestinal organoids" lub „enteroids" lub „colonoids" (te nazwy używane są wymiennie) generuje w bazie *PubMed* 435 pozycji, z czego 413 pochodzi z ostatnich pięciu

lat. Świadczy to o dynamicznym wzroście wykorzystania tego modelu w badaniach biomedycznych. Jednakże tylko w dwóch z tych publikacji jak dotąd (oprócz pięciu publikacji naszego autorstwa) wykorzystano tkanki ptaków do tworzenia hodowli „minijelit" (Li i wsp. 2018, Powell and Behnke 2017), przy czym w obu publikacjach cytowana jest praca mojego autorstwa (oznaczona w niniejszym autoreferacie jako *PI)*. Mam nadzieję, że nasz udoskonalony model wzbudzi w przyszłości zainteresowanie zespołów zajmujących się immunologią ptaków, fizjologią przewodu pokarmowego tej gromady kręgowców, a także badaczy współpracujących z hodowcami i poszukujących najlepszych sposobów testowania wpływu różnych, w tym probiotycznych, dodatków do pasz dla drobiu. Może mieć to znaczenie praktyczne dla rozwoju udoskonalonych technik hodowli różnych gatunków ptaków.

Otrzymywanie organoidów jelitowych w wiszącej kropli jest naszym oryginalnym pomysłem, który może być również wykorzystany do hodowli organoidów ssaków. Jak dotąd tylko jedna publikacja donosi o hodowli organoidów jelitowych (tak zwanych indukowanych jelit – ang. *i-gut)* w wiszącej kropli, w tym przypadku jednak pochodzą one z mysich komórek macierzystych (Ueda i wsp. 2010). Żaden inny zespół nie próbował dotychczas tego sposobu hodowli w przypadku izolowanych fragmentów nabłonka jelitowego zarodków lub krypt z jelit dorosłych osobników. Mam jednak przekonanie, że jest to możliwe, o czym świadczą wstępne wyniki, uzyskane w ramach projektu badawczego realizowanego przez współpracującą ze mną studentkę studiów doktoranckich mgr Małgorzatę Panek (grant nr BM 4796/KBŻ/2015 dla M. Panek) na modelu mysim. Praca w oparciu o te wyniki jest obecnie w przygotowaniu, wyniki opublikowano również w postaci materiałów pokonferencyjnych (Gawin i wsp. 2016). W związku z tym liczymy, że metoda ta znajdzie zastosowania w doświadczeniach ukierunkowanych na szybkie oraz efektywne przesiewowe badania leków czy bioaktywnych składników żywności, a praca ją opisująca *(PV)* będzie cytowana przez innych badaczy.

Chociaż rola PGE_2 w stymulowaniu podziałów komórek macierzystych krypt jelitowych była podkreślana przez wielu autorów, w dotychczas opublikowanych pracach innych zespołów badawczych nie ma danych na temat profilu produkowanych przez organoidy jelitowe pochodnych kwasu arachidonowego. Pokazanie, iż jedną z dominujących prostaglandyn produkowanych przez organoidy jelitowe pochodzące z zarodków kurzych jest PGD_2, powinno zwrócić uwagę na rolę tego mediatora w homeostazie nabłonka jelit kręgowców i stymulować kolejne badania ukierunkowane na wyjaśnienie wpływu różnych pochodnych kwasu arachidonowego na proliferację i różnicowanie komórek w obrębie krypt. Obecność w hodowlach organoidów dużej ilości produktów enzymatycznego przekształcania prostaglandyn (w porównaniu do samych fibroblastów) wskazuje na ważną cechę modelu organoidów, który może lepiej oddawać przemiany prostanoidów. Planujemy

dalsze wykorzystanie tego modelu w badaniach przemian prostanoidów i modulacji stanu zapalnego w śluzówce jelitowej. Badania te mogą okazać się istotne i otworzyć nową perspektywę wyjaśnienia nieznanych dotąd elementów etiologii chorób przewodu pokarmowego ludzi i zwierząt, a także przyczynić się do wynalezienia nowych sposobów leczenia tych schorzeń.

W skład cyklu prac osiągnięcia habilitacyjnego wchodzi również publikacja przeglądowa omawiająca wpływ bioaktywnych składników żywności na odpowiedź komórek na stymulację TLR przez ligandy pochodzące z mitochondriów *(zob. PVI)*. Pracę tę napisałam dla czasopisma „Mitochondrion", wybierając temat, który związany jest z przyszłymi planami wykorzystania modelu organoidów jelitowych w kolejnych projektach, które mam nadzieję realizować w niedalekiej przyszłości. W planach badawczych uwzględniam dotychczasowe zainteresowania naukowe moje i moich najbliższych współpracowników, które obejmują udział mitochondriów i receptorów TLR w homeostazie śluzówek przewodu pokarmowego oraz działanie bioaktywnych składników żywności. Hipotezy, jakie zamierzam postawić, opierają się na dobrze udokumentowanym zjawisku, że uszkadzane mitochondria uwalniają ligandy receptorów rozpoznających wzorce molekularne.

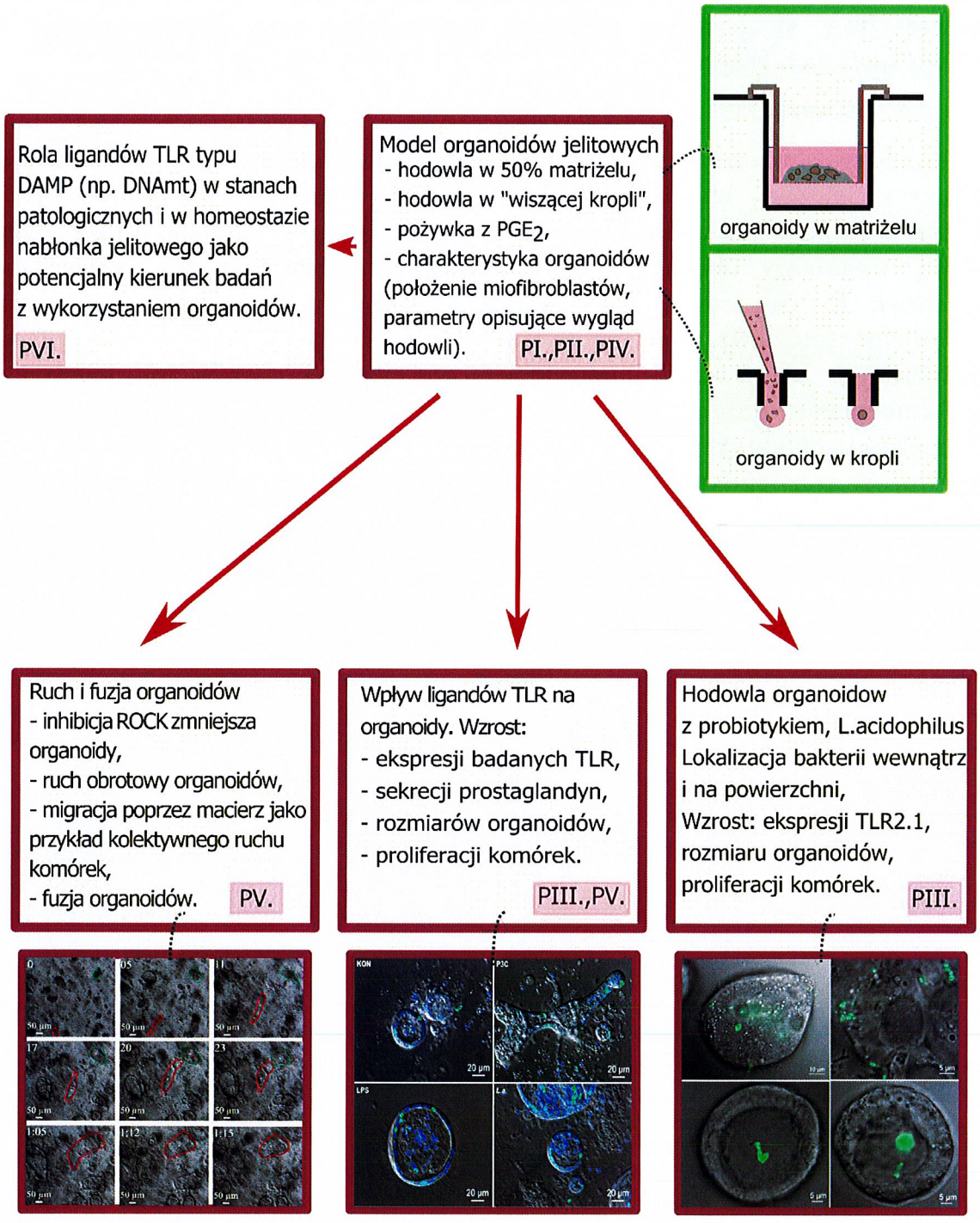
Ze względu na ewolucyjne pochodzenie mitochondriów od endosymbiotycznych proteobakterii składniki budulcowe tych organelli są szczególnie dobrymi aktywatorami różnych receptorów rozpoznających wzorce molekularne związane z uszkodzeniem (DAMPs). Na przykład krótkie odcinki mitochondrialnego kwasu deoksyrybonukleionowego (mtDNA, zawierające tak zwane „niemetylowane wyspy CpG") mają zdolność aktywacji receptora TLR9. W pracy przeglądowej omawiam fakt powiązania polimorfizmu genu TLR9 z różnymi chorobami o podłożu immunologicznym, w tym chorobami jelit, a także przebiegiem infekcji przewodu pokarmowego spowodowanym na przykład przez *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* lub *Helicobacter pylori*. Wskazuję również na fakt, że homeostaza w nabłonkach jelitowym i oddechowym związana jest z aktywacją TLR9. Główną omawianą w publikacji *PVI* hipotezą jest możliwy związek między szlakiem sygnalizacji receptorów rozpoznających DAMPs a działaniem składników żywności podejrzewanych o właściwości przeciwzapalne i przeciwnowotworowe, takich jak kurkumina (składnik przyprawy curry o budowie polifenolowej), lub sulforafan (izotiocyjanian z roślin krzyżowych). Zależność ta, która może się ujawniać w śluzówce jelitowej *in vivo*, mogłaby być zbadana w układzie modelowym *in vitro* z wykorzystaniem organoidów.

Zjawisko ruchu organoidów – a szerzej: zespołowego ruchu komórek – nie jest do końca wyjaśnione, budzi jednak duże zainteresowanie badaczy zajmujących się mechanobiologią komórkową. Badanie ruchu i fuzji organoidów jelitowych może być istotne z punktu widzenia klinicznego zastosowania transplantacji tych organoidów dla przyspieszenia regeneracji jelit po urazach (Yui i wsp. 2012). Stwarza też możliwość poszerzenia wiedzy

na temat mechanizmów rozwojowych (w których zarodek kurzy jest powszechnie stosowanym modelem badawczym) oraz nowotworzenia. W zjawiskach tych zespołowy ruch komórek odgrywa kluczowe znaczenie.

4.3.5 Podsumowanie

Cel podjętych przeze mnie przed kilku laty badań nad opracowaniem modelu śluzówki jelitowej kur *in vitro* został w dużej części zrealizowany. Wyniki opublikowane w pracach składających się na moje osiągnięcie habilitacyjne mają oryginalny charakter i są ze sobą tematycznie powiązane (*zob. Rysunek 1).* Opracowanie i dogłębna charakterystyka modelu kurzych „minijelit" umożliwia jego zastosowanie w przyszłych projektach badawczych dotyczących immunologii śluzówki jelitowej, roli receptorów Toll-podobnych w homeostazie nabłonka oraz stosowania bakterii probiotycznych jako elementu profilaktyki i terapii chorób o podłożu zapalnym. Istnieje też szansa na to, że na podstawie uzyskanych przeze mnie wyników dojdzie do udoskonalania modeli organoidów jelitowych pochodzących z komórek innych gatunków (na przykład poprzez wykorzystanie techniki wiszącej kropli). Moje dalsze plany badawcze zakładają prace – z wykorzystaniem zarówno modelu kurzego, jak i modeli mysich – w celu wykazania ewentualnych różnic w roli receptorów Toll-podobnych dla homeostazy śluzówki jelit ptaków i ssaków.



Rysunek 1 Podsumowanie graficzne i syntetyczny opis wyników cyklu prac stanowiących podstawę osiągnięcia habilitacyjnego. Zdjęcie **A** przedstwia dynamikę hodowli organoidów w matriżelu. W pierwszym dniu hodowli organoidy przemieszczają się aktywnie, zmieniają kształt i fuzjują (czas hodowli – d:gg, w górnym lewym rogu). Zdjęcie **B** przedstawia komórki proliferujące (ich jądra charakteryzuje zielona fluorescencja) w organoidach niestymulowanych ligandami TLR (KON), stymulowanych przez 2 dni ligandem TLR2 (P3CSK4, 2 μg/ml) oraz ligandem TLR4 (LPS, 1 μg/ml); a także organoidy hodowane w obecnosci żywych bakterii *Lactobacillus acidophilus* LA5 (*L.a.*). Zdjęcia **C** pokazują wspólną hodowlę organoidów i bakterii wybarwionych FITC (zielona fluorescencja). Bakterie znajdują się zarówno wewnątrz, jak i na zewnątrz organoidów.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć badawczych

5.1 Omówienie tematyki publikacji nie wchodzących w skład dzieła habilitacyjnego

Moje osiągnięcia badawcze wykraczają poza główną tematykę dzieła habilitacyjnego i wiążą się z różnorodnymi zagadnieniami naukowymi. Na zadania, które podejmowałam w przebiegu mojej pracy zawodowej, mieli także wpływ mentorzy i współpracownicy, których spotkałam na mojej naukowej drodze.

Pierwsze osiem lat mojej pracy naukowej związane było z Instytutem Biologii Molekularnej Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UJ (obecnie wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ), gdzie w Zakładzie Biologii Komórki, kierowanym wówczas przez prof. dr hab. Włodzimierza Korohodę, przygotowałam pracę magisterską i pracę doktorską. To inspirujące intelektualnie i ciekawe otoczenie było idealnym miejscem dla realizacji moich zainteresowań mechanobiologią komórek i tkanek, ruchem komórek i strukturą cytoszkieletu oraz metodami pierwotnych hodowli komórkowych. Przyczyniło się również do rozwoju mojego warsztatu badacza poprzez umożliwienie mi nabycia wielu cennych umiejętności w zakresie hodowli komórkowych i mikroskopowania. Jako temat pracy doktorskiej wybrałam zagadnienie z pogranicza biologii komórki i biologii medycznej dotyczące wpływu środków znieczulających miejscowo (na przykład prokainy) na cytoszkielet komórek eukariotycznych. Zaowocowało to współautorstwem następujących publikacji:

Wodnicka M., **Pierzchalska M.**, Bereiter-Hahn J., Kajstura J. (1992) Comparative study on effects of cytochalasins B and D on F-actin content in different cell lines and different culture conditions. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 30(3), 107-11.

Korohoda W., Michalik M., **Pierzchalska M.** (1994) Benzamide-induced changes in the actin cytoskeleton in human skin fibroblasts. *Cell. Biol. Int.*, 18(8): 791-6.

Michalik M., **Pierzchalska M.**, Pabiańczyk-Kulka A., Korohoda W. (2003) Procaine-induced enhancement of fluid-phase endocytosis and inhibition of exocytosis in human skin fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.*, 475(1-3): 1-10.

W tym okresie w wyniku realizacji grantu promotorskiego KBN *Wpływ wybranych środków znieczulających miejscowo na organizację cytoszkieletu, kształt i wakuolizację fibroblastów skóry ludzkiej w hodowli* przygotowałam i obroniłam pracę doktorską, której główne tezy stały się podstawą publikacji w *European Journal of Pharmacology*:

Pierzchalska M., Michalik M., Stępień E., Korohoda W. (1998) Changes in morphology of human skin fibroblasts induced by local anaesthetics: Role of actomyosin contraction. *Eur. J. Pharmacol.*, 358(3): 235-44.

Kolejnym etapem, bardzo ważnym z punktu widzenia mojego rozwoju naukowego, była praca w zespole badawczym zajmującym się biologicznymi

podstawami astmy, stworzonym przez prof. dr hab. n. med. Andrzeja Szczeklika w II Katedrze Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum UJ. W ramach prac tego zespołu zorganizowałam pracownię hodowli komórkowych, biorąc udział w wyborze odpowiedniego wyposażenia i aparatury naukowej, opracowaniu metod hodowli komórek pochodzących ze śluzówki drzewa oskrzelowego i stworzeniu banku fibroblastów oskrzelowych i nabłonków izolowanych od pacjentów chorych na astmę z wycinków pobranych w trakcie procedury bronchoskopii. We wprowadzeniu metod hodowli pierwotnych fibroblastów oskrzelowych oraz komórek nabłonka oskrzelowego pomogły mi staże naukowe w Anglii (w Imperial Collage of London i na Uniwersytecie w Southampton). W wiodących ośrodkach badawczych zajmujących się tematyką biologicznych podstaw astmy oskrzelowej mogłam się nauczyć metod izolacji i hodowli komórek pierwotnych pochodzących z oskrzeli pacjentów. Pozwoliło to następnie na wykonanie badań, w których porównywaliśmy *in vitro* niektóre cechy komórek pochodzących od ludzi chorych na astmę (przebiegającą z nadwrażliwością na aspirynę oraz atopową) z cechami komórek izolowanych od ludzi niecierpiących na astmę. Celem tych prac było wyjaśnienie etiologii astmy, w tym w szczególności astmy aspirynowej. W tym okresie starałam się również o własne środki na badania i byłam kierownikiem projektu KBN *Regulacja syntezy leukotrienów cysteinylowych i lipoksyn w komórkach linii Hl-60 różnicowanych do granulocytów i makrofagów* (lata 1999–2000) oraz kierownikiem projektu, będącego projektem statutowym CMUJ 501/KL/617/L, *Synteza PGE_2 oraz ekspresja COX-1 i COX-2 w komórkach nabłonka oskrzelowego astmatyków* (lata 2003–2006). W trzech z pięciu publikacji z tego okresu byłam głównym pomysłodawcą, wykonawcą i pierwszym autorem – ich łączny IF wynosi 14,244, a łączna liczba prac cytujących właśnie te trzy publikacje równa się 160. Można sądzić, że zostały one zauważone i docenione przez środowisko badaczy zainteresowanych patogenezą astmy oskrzelowej:

Pierzchalska M., Mastalerz L., Sanak M., Zazula M., Szczeklik A. (2000) A moderate and unspecific release of cysteinyl leukotrienes by aspirin from peripheral blood leucocytes precludes its value for aspirin sensitivity testing in asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 30(12): 1785-91.

Sanak M., **Pierzchalska M.**, Bazan-Socha S., Szczeklik A. (2000) Enhanced expression of the leukotriene C_4 synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 23(3):290-6.

Mastalerz L., Niżankowska E., Sanak M., Mejza F., **Pierzchalska M.**, Bazan-Socha S., Bestyńska-Krypel A., Ćmiel A., Szczeklik A. (2002) Clinical and genetic features underlying the response of patients with bronchial asthma to treatment with a leukotriene receptor antagonist. *Eur. J. Clin. Invest.*, 32(12): 949-55.

Pierzchalska M., Szabó Z., Sanak M., Soja J., Szczeklik A. (2003) Deficient prostaglandin E_2 production by bronchial fibroblasts of asthmatic patients, with special reference to aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111(5): 1041-8.

Pierzchalska M., Soja J., Woś M., Szabó Z., Niżankowska-Mogilnicka E., Sanak M., Szczeklik A. (2007) Deficiency of cyclooxygenases transcripts in cultured primary bronchial epithelial cells of aspirin-sensitive asthmatics. *J. Physiol. Pharmacol.*, 58(2): 207-18.

W kolejnych latach, kontynuując moje zainteresowanie tematyką związaną z patofizjologią astmy, brałam udział w badaniach nad mechanizmem przejścia fenotypowego fibroblasty – miofibroblasty (ang. *fibroblasts to myofibroblasts transition,* FMT), prowadzonych w Zakładzie Biologii Komórki Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii UJ we współpracy z Collegium Medicum UJ. FMT to zjawisko towarzyszące procesowi przebudowy (ang. *remodeling*) tkanki (na przykład ściany oskrzeli) w przebiegu astmy oskrzelowej oraz innych chorób zwłóknieniowych. Prace z tej tematyki to:

Michalik M., **Pierzchalska M.**, Legutko A., Ura M., Ostaszewska A., Soja J., Sanak M. (2009) Asthmatic bronchial fibroblasts demonstrate enhanced potential to differentiate into myofibroblasts in culture. *Med Sci. Monit.*, 15(7): BR194-201.

Michalik M., **Pierzchalska M.**, Włodarczyk A., Wójcik K.A., Czyż J., Sanak M., Madeja Z. (2011) Transition of asthmatic bronchial fibroblasts to myofibroblasts is inhibited by cell-cell contacts. *Respir. Med.*, 105(10): 1467-75.

Michalik M., Soczek E., Kosińska M., Rak M., Wójcik K.A., Lasota S., **Pierzchalska M.**, Czyż J., Madeja Z. (2013) Lovastatin-induced decrease of intracellular cholesterol level attenuates fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial fibroblasts derived from asthmatic patients. *Eur. J. Pharmacol.* 704(1-3): 23-32.

Paw M., Borek I., Wnuk D., Ryszawy D., Piwowarczyk K., Kmiotek K., Wójcik-Pszczoła K.A., **Pierzchalska M.,** Madeja Z., Sanak M., Błyszczuk P., Michalik M., Czyż J. (2017) Connexin43 controls the myofibroblastic differentiation of bronchial fibroblasts from patients with asthma. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* 57(1): 100-110.

W 2006 roku, po rozpoczęciu pracy na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie na Wydziale Technologii Żywności w Katedrze Biotechnologii Żywności, podjęłam się wraz z dr Mają Grabacką zadania prowadzącego do zwiększenia potencjału badawczego jednostki – organizacji pracowni hodowli komórkowej i tkankowej oraz pracowni mikroskopowej. W następnych latach wyposażenie pracowni wzbogaciło się, dzięki moim staraniom, o odwrócony mikroskop fluorescencyjny, co umożliwia nam obecnie stosowanie zaawansowanych technik mikroskopii i analizy obrazu. Zakup mikroskopu fluorescencyjnego najnowszej generacji Zeiss Axio Observer.Z1 wraz z wyposażeniem został zrealizowany dzięki pozyskaniu przez Wydział Technologii Żywności UR dotacji MNiSW na inwestycję w zakresie dużej infrastruktury badawczej, której dokumentację przygotowałam. Mikroskop

wyposażony w przystawkę do długotrwałej przyżyciowej obserwacji komórek umożliwia badanie dynamiki procesów komórkowych poprzez technikę rejestracji poklatkowej, co wykorzystałam w badaniach nad organoidami jelitowymi. Pozwoliło to także na wprowadzenie do badań naukowych innych pracowników Wydziału nowych metod związanych z hodowlą komórkową i tkankową oraz zaawansowanych technik mikroskopowania. Prowadziliśmy między innymi badania nad biodostępnością fosforanów inozytolu uwalnianych w chlebie z kwasu fitynowego przez dodane do niego enzymy – fitazy, wykorzystując przy tym model nabłonka jelita cienkiego złożonego ze zróżnicowanych komórek Caco-2. Prace z tej tematyki to:

Duliński R., Cielecka E.K., **Pierzchalska M.**, Byczyński L., Żyła K. (2016) Profile and bioavailability analysis of myo-inositol phosphates in rye bread supplemented with phytases: A study using an in vitro method and Caco-2 monolayers. *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, 67(4): 454-60.

Duliński R., Cielecka E.K., **Pierzchalska M.**, Żyła K. (2015) Phytases improve myo-inositol bioaccessibility in rye bread: A study using an *in vitro* method of digestion and a Caco-2 cell culture model. *Food Technol. Biotechnol.*, 53(1): 66-72.

Jednocześnie uczestniczyłam w niektórych projektach badawczych kierowanych przez prof. dr hab. inż. Krzysztofa Żyłę, którego zainteresowania koncentrują się między innymi na enzymatycznej biokonwersji fitynianów z żywności i pasz oraz na biologicznej roli inozytolu i jego fosforanów. Prace z tej tematyki, których jestem współautorem, to:

Żyła K., Grabacka M., **Pierzchalska M.**, Duliński R., Starzyńska-Janiszewska A. (2013) Effect of inositol and phytases on hematological indices and α-1 acid glycoprotein levels in laying hens fed phosphorus-deficient corn-soybean meal-based diets. *Poult. Sci.*, 92(1): 199-204.

Żyła K., Duliński R., **Pierzchalska M.**, Grabacka M., Józefiak D., Świątkiewicz S. (2013) Phytases and myoinositol modulate performance, bone mineralization and alter lipid fractions in the serum of broilers. *J. Anim. Feed Sci.*, 22(1): 56-62.

W ramach projektów kierowanych przez dr Maję Grabacką z Katedry Biotechnologii Żywności we współpracy z zespołem prof. dr hab. Krzysztofa Reissa (z Centrum Badań nad Rakiem w Luizjanie, *Louisiana Cancer Research Center*, Nowy Orlean, USA) brałam też udział w badaniach dotyczących wpływu ligandów receptorów aktywowanych proliferatorami peroksysomów alfa (PPARα) na fizjologię i metabolizm komórek nowotworowych. Publikacje podejmujące ten temat to:

Grabacka M., **Pierzchalska M.**, Reiss K. (2013) Peroxisome proliferator activated receptor α ligands as anticancer drugs targeting mitochondrial metabolism. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 14(3): 342-56.

Grabacka M., **Pierzchalska M.**, Dean M., Reiss K. (2016) Regulation of ketone body metabolism and the role of PPARα. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(12): 2093.

Grabacka M., Wilk A., Antończyk A., Banks P., Walczyk-Tytko E., Dean M., **Pierzchalska M.**, Reiss K. (2016) Fenofibrate induces ketone body production in melanoma and glioblastoma cells. *Front. Endocrinol.*, 7: 5.

W pracy o charakterze przeglądowym analizowaliśmy też zagadnienie wpływu niektórych związków chemicznych pochodzenia roślinnego na funkcjonowanie mitochondriów w kontekście profilaktyki nowotworów.

Grabacka M., Gawin M., **Pierzchalska M.** (2014) Phytochemical modulators of mitochondria: The search for chemopreventive agents and supportive therapeutics. *Pharmaceuticals*, 7(9): 913-42.

5.2. Pozostała działalność zawodowa, w tym dydaktyczna i organizacyjna, związana z doskonaleniem warsztatu badacza

Przez większą część mojej pracy zawodowej zatrudniona byłam na etacie naukowo-dydaktycznym i starałam się, aby moja aktywność na polu nauczania była ściśle związana z działalnością badawczą. Największą zaletą takiej ścieżki kariery jest ciągły impuls do samodoskonalenia i zdobywania wiedzy nie tylko w wąskim zakresie aktualnej tematyki badawczej, ale również z całej dziedziny, do której ta tematyka należy. Kontakt z młodymi ludźmi, którym chce się przekazać aktualny stan wiedzy, zachęca do takiej właśnie aktywności. Jako asystent przed uzyskaniem stopnia doktora w latach 1990-1998 prowadziłam dla studentów biologii UJ (specjalność: biologia molekularna) zajęcia z biologii komórki, a także przygotowywałam i prowadziłam wraz z kolegami kurs *Nowoczesne metody w biologii molekularnej*. W moim obecnym miejscu pracy, na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie, za swoje największe osiągnięcie dydaktyczne uważam opracowanie, przygotowanie od podstaw oraz prowadzenie kursu *Fizjologia komórki roślinnej i zwierzęcej* dla studentów II roku studiów pierwszego stopnia na kierunku technologia żywności, specjalności biotechnologia i bioprocesy (ćwiczenia obejmujące 60 lub 45 godzin zajęć laboratoryjnych oraz 30 godzin wykładu). Oprócz tego prowadzę zajęcia w ramach kursów biochemii, enzymologii, bioetyki i nowoczesnych techniki analitycznych w biotechnologii, realizując każdego roku około 300 godzin dydaktycznych. W roku 2014 prowadziłam również zajęcia w języku angielskim z biotechnologii żywności dla zagranicznych pracowników dydaktycznych, którzy dokształcali się w Krakowie w ramach współpracy między Uniwersytetem Rolniczym a Politechniką w Bauchi w Nigerii.

Ważną częścią mojej pracy dydaktycznej jest opieka nad studentami przygotowującymi prace magisterskie i inżynierskie. W ostatnich dziesięciu latach pod moim kierunkiem powstały 24 prace inżynierskie i 18 prac magisterskich (9 wypromowanych prac wiązało się z uzyskaniem przez studentów tytułu magistra inżyniera technologii żywności, w 9 przypadkach studenci uzyskali tytuł magistra inżyniera biotechnologii). Tematyka tych prac przeważnie związana była ściśle z realizowanymi przeze mnie projektami badawczymi. Rzadziej, była wynikiem realizacji twórczych pomysłów samych studentów. W wielu przypadkach magistranci, którymi się opiekowałam,

zostawali współautorami prac doświadczalnych lub komunikatów zjazdowych, a także prezentowali swoje wyniki na studenckich konferencjach naukowych. Jeden z promowanych przeze mnie studentów, mgr Damian Pieróg, otrzymał I nagrodę w konkursie im. prof. Franciszka Nowotnego na najlepszą pracę magisterską napisaną na Wydziale Technologii Żywności w roku 2017.

Ważną formą aktywności uczonego w dzisiejszych czasach jest prezentowanie wyników na zjazdach i spotkaniach naukowych, które stanowią okazję dla promocji własnych osiągnięć i nawiązania wartościowych kontaktów z innymi badaczami o podobnych zainteresowaniach. Dlatego też wyniki moich badań prezentowałam w formie wykładów lub plakatów (ponad trzydzieści razy) na wielu konferencjach w Polsce i zagranicą, uzyskując nagrody: za najlepszą prezentację ustną (w trakcie XIX Międzynarodowej Konferencji *Risk factors of food chain*, w Mátrafüred na Węgrzech w roku 2018) i najlepszy plakat *(III European Asthma Congress*, w Atenach, w Grecji, w roku 2005). Korzystałam też zawsze z możliwości, aby uczestniczyć w kursach i szkoleniach organizowanych przez międzynarodowe towarzystwa naukowe (n.p. FEBS, EMBO, PoLlasa) lub firmy biotechnologiczne lub producentów sprzętu do badań naukowych. Szczegółowy opis mojej aktywności w tym zakresie zawiera *Załącznik 4.*

Oprócz przekazywania wiedzy młodszym kolegom i studentom, co robię w ramach obowiązków nauczyciela akademickiego, interesuje mnie również zagadnienie popularyzacji nauki. O moich umiejętnościach w tym zakresie świadczy współpraca z jednym z najważniejszych polskich tygodników opinii o dużym nakładzie i zasięgu oddziaływanie, jakim jest „Polityka". W piśmie tym wielokrotnie publikowałam teksty popularnonaukowe. Jako pracownik Uniwersytetu Rolniczego brałam też udział w przygotowaniu wydarzeń promujących naukę, takich jak *Noc Naukowców*, oraz wykładu dla uczniów gimnazjów i liceów odwiedzających naszą uczelnie w ramach *Uniwersytetu dla młodzieży.*

W ramach moich obowiązków organizacyjnych jestem również od 2014 roku członkiem Wydziałowej Komisji ds. Rozwoju Naukowego, biorąc aktywny udział zarówno w opiniowaniu wniosków studentów studiów doktoranckich o otwarcie przewodów doktorskich, jak i w przyznawaniu środków finansowych na badania dla pracowników i doktorantów Wydziału Technologii Żywności w ramach programu *Badania młodych.* Prace w tej komisji stwarzają cenną możliwość zapoznania się z całokształtem tematyki badawczej Wydziału, który obejmuje wiele różnych zagadnień z szeroko rozumianych badań żywieniowych i technologii żywności. W latach 2007 i 2008 byłam także sekretarzem Komisji Rekrutacyjnej Studiów Stacjonarnych I stopnia na Wydziale Technologii Żywności UR.

Opiekując się na co dzień pracownią hodowli komórkowej i tkankowej oraz pracownią mikroskopii fluorescencyjnej, staram się pomagać studentom studiów pierwszego i drugiego stopnia oraz doktorantom, a także moim kolegom realizującym projekty wymagające wykorzystania zaawansowanej

aparatury badawczej. Mam wrażenie, że tym samym udaje mi się ciągle poszerzać swoją wiedzę na temat sposobów potencjalnego wykorzystania narzędzi badawczych oraz zwiększać umiejętności w zakresie różnych technik laboratoryjnych. Część czasu wolnego od obowiązków zawodowych spędzam również, działając na rzecz społeczności akademickiej. Od roku 2014 jestem przedstawicielem Wydziału Technologii Żywności w Komisji Uczelnianej jednego z dwóch związków zawodowych działających na Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie, a także przedstawicielem tego Związku w Komisji Senackiej ds. Nauki i Współpracy z Zagranicą.

	CYKL PRAC			POZOSTAŁE PRACE			OGÓŁEM		
	liczba	**IF**	**pkt**	**liczba**	**IF**	**pkt**	**liczba**	**IF**	**pkt**
Doświadczalne	4	8,237	100	19	41,410	363	23	49,647	463
Przeglądowe	1	3,704	30	5	9,412	42	6	13,124	72
Rozdziały w monografiach	1	-	5		-	-	1	-	-
RAZEM	6	11,941	135	24	50,822	405	30	**62,763**	565
Publikacje przed doktoratem				4	3,034	20	4	3,034	20
Publikacje po doktoracie				20	47,788	185	26	**59,729**	545
Indeks Hirsha	**12**								
Całkowita liczba cytowań	**541**								
- w tym bez autocytowań	**522**								

TABELA 1. Bibliometryczne podsumowanie dorobku naukowego (dane dotyczące liczby cytowań pobrane z bazy *Web of Science - Core Collection* dnia 21.11.2018)

4. PODSUMOWANIE

Polem moich działań naukowych, które pozostaje właściwie niezmienne od czasu studiów, jest biologia komórki, a przedmiotem moich szczególnych zainteresowań są zjawiska oraz procesy, takie jak mechanobiologia na poziomie komórkowym, przemiany cytoszkieletu, przekaz sygnału, czy rola prostanoidów w modulacji procesów komórkowych. Uważam, że ważnym elementem w badaniach przyrodniczych są modele *in vitro* oparte na pierwotnych hodowlach komórkowych i tkankowych, dlatego starałam się w swoich projektach stosować i udoskonalać właśnie takie metody. Moja droga naukowa wiodła poprzez etapy, które wymagały wykorzystania wiedzy i umiejętności biologa komórki dla rozwoju badań o istotnym znaczeniu praktycznym. Przykładem takiego podejścia jest opracowanie modelu kurzych organoidów jelitowych i próba jego wykorzystania w badaniach nad fizjologią przewodu pokarmowego ptaków – działania stanowiące treść cyklu prac osiągnięcia habilitacyjnego.

Mój dorobek, który w bibliometrycznym skrócie przedstawia *Tabela 1*, jest tematycznie różnorodny i balansuje na styku biologii z biotechnologią, medycyną, nauką o żywności i zootechniką. Jak sądzę, może on stanowić przykład, że dla rozwoju naukowego ważna jest umiejętność twórczego wykorzystania posiadanego warsztatu badacza do rozwiązywania różnorodnych problemów naukowych.

Kraków, dnia 23 listopada 2018 Małgorzata Pierzchalska

7. BIBLIOGRAFIA

Abreu M.T. (2010) Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.,* 10:131–44. doi: 10.1038/nri2707

Asghar W., El Assal R., Shafiee H. i wsp. (2015) Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. *Mater. Today,* 18:539–553. doi: 10.1016/j.mattod.2015.05.002

Chin A.M., Hill D.R., Aurora M., Spence J.R. (2016) Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. *Semin. Cell Dev. Biol.,* 66:81–93. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.01.011

Ciorba M.A., Riehl T.E., Rao M.S. i wsp. (2012) *Lactobacillus* probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner. *Gut,* 61:829–838. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300367

Figtree G.A., Bubb K.J., Tang O. i wsp. (2017) Vascularized cardiac spheroids as novel 3D *in vitro* models to study cardiac fibrosis. *Cells Tissues Organs,* 204:191–198. doi: 10.1159/000477436

Finkbeiner S.R., Spence J.R. (2013) A gutsy task: generating intestinal tissue from human pluripotent stem cells. *Dig. Dis. Sci.,* 58:1176–84.

Finkbeiner S.R., Zeng X., Utama B. i wsp. (2012) Stem cell-derived human intestinal organoids as an infection model for rotaviruses. *MBio,* 3:1–6. doi: 10.1128/mBio.00159-12

Ganguli K., Meng D., Rautava S. i wsp. (2013) Probiotics prevent necrotizing enterocolitis by modulating enterocyte genes that regulate innate immune-mediated inflammation. *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304:G132-41. doi: 10.1152/ajpgi.00142.2012

Gawin M., Pierzchalska M., Grabacka M. (2016) Mouse intestinal organoids cultured in hanging drop. *N. Biotechnol.*, 33:S79. doi: https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.991

Goessling W., North TE., Loewer S. i wsp. (2009) Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell,* 136:1136–1147. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.015.Genetic

Grainger S., Hryniuk A., Lohnes D. (2013) Cdx1 and Cdx2 exhibit transcriptional specificity in the intestine. *PLoS One,* 8:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0054757

Hillier L.W., Miller W., Birney E., i wsp. (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature,* 432:695–716. doi: 10.1038/nature03154

In J.G., Foulke-Abel J., Estes M.K. i wsp. (2016) Human mini-guts: new insights into intestinal physiology and host-pathogen interactions. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 13:633–642.

Jabaji Z., Brinkley G.J., Khalil H.A. i wsp. (2014) Type I collagen as an extracellular matrix for the in vitro growth of human small intestinal epithelium. *PLoS One,* 9:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0107814

Jayaraman S., Thangavel G., Kurian H., i wsp. (2013) *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poult. Sci.*, 92:370–374. doi: http://dx.doi.org/ 10.3382/ps.2012-02528

Kalabusheva E., Terskikh V., Vorotelyak E. (2018) Method of the year 2017: organoids. *Nat. Methods,* 15:1. doi: 10.1155/2017/9271869

Karve S.S., Pradhan S., Ward D.V., Weiss A.A. (2017) Intestinal organoids model human responses to infection by commensal and Shiga toxin producing Escherichia coli. *PLoS One,* 12:1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0178966

Kuo C.T., Wang J.Y., Lin Y.F. i wsp. (2017) Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array. *Sci. Rep.*, 7(1):4363. doi: 10.1038/s41598-017-04718-1

Lahar N., Lei N.Y., Wang J. i wsp. (2011) Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. *PLoS One,* 6:e26898. doi: 10.1371/journal.pone.0026898

Li J., Li J., Zhang S.Y., i wsp. (2018) Culture and characterization of chicken small intestinal crypts. *Poult. Sci.,* 97:1536–1543. doi: 10.3382/ps/pey010

Lin B., Miao Y., Wang J. i wsp. (2016) Surface tension guided hanging-drop: producing controllable 3D spheroid of high-passaged human dermal papilla cells and forming inductive microtissues for hair-follicle regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces,* 8:5906–5916. doi: 10.1021/acsami.6b00202

Lutful Kabir S.M. (2009) The role of probiotics in the poultry industry. *Int. J. Mol. Sci.,* 10:3531–3546. doi: 10.3390/ijms10083531

Markowiak P., Śliżewska K. (2017) Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients,* 9:1–30. doi: 10.3390/nu9091021

Markowiak P., Śliżewska K. (2018) The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog.*, 10:1–20.

Mazzoleni G., Di Lorenzo D., Steimberg N. (2009) Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.*, 4:13–22. doi: 10.1007/s12263-008-0107-0

Miyoshi H., VanDussen K.L., Malvin N.P. i wsp. (2017) Prostaglandin E_2 promotes intestinal repair through an adaptive cellular response of the epithelium. *EMBO J.,* 36:5–24. doi: 10.15252/embj.201694660

Mottet A., Tempio G. (2017) Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *Worlds Poult. Sci. J.*, 73:245–256. doi: 10.1017/S0043933917000071

Mustata R.C., Vasile G., Fernandez-Vallone V. i wsp. (2013) Identification of Lgr5-independent spheroid-generating progenitors of the mouse fetal intestinal epithelium. *Cell Rep.*, 5:421–432. doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.005

Neal M.D., Sodhi C.P., Jia H. i wsp. (2012) Toll-like receptor 4 is expressed on intestinal stem cells and regulates their proliferation and apoptosis via the p53 up-regulated modulator of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 287:37296–308. doi: 10.1074/jbc.M112.375881

Ootani A., Li X, Sangiorgi E., i wsp. (2009) Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat. Med., 1*5:701–706. doi: 10.1038/nm.1951

Pott J., Hornef M. (2012) Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO Rep.*, 13:684–698. doi: 10.1038/embor.2012.96

Powell R.H., Behnke M.S. (2017) WRN conditioned media is sufficient for *in vitro* propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals. *Biol. Open,* 698–705. doi: 10.1242/bio.021717

Rakoff-Nahoum S., Medzhitov R. (2008) Role of Toll-like receptors in tissue repair and tumorigenesis. *Biochem.,* 73:555–561. doi: 10.1134/S0006297908050088 Key

Roto S.M., Kwon Y.M., Ricke S.C. (2016) Applications of *in ovo* technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. *Front. Vet. Sci.,* 3:1–13. doi: 10.3389/fvets.2016.00063

Round J.L., Mazmanian S.K. (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.,* 9:313–23. doi: 10.1038/nri2515

Sachs N., Tsukamoto Y., Kujala P. i wsp. (2017) Intestinal epithelial organoids fuse to form self-organizing tubes in floating collagen gels. *Development,* 144:1107–1112. doi: 10.1242/dev.143933

Sato T., Clevers H. (2013) Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science,* 340:1190–1194. doi: 10.1126/science.1234852

Sato T., Vries R.G., Snippert H.J. i wsp. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature,* 459:262–5. doi: 10.1038/nature07935

Sommer F., Bäckhed F. (2013) The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11:227–238. doi: 10.1038/nrmicro2974

Stern C.D. (2005) The chick: A great model system becomes even greater. *Dev. Cell*, 8:9–17. doi: 10.1016/j.devcel.2004.11.018

Trevelline B.K., MacLeod K.J., Knutie S.A. i wsp. (2018) *In ovo* microbial communities: a potential mechanism for the initial acquisition of gut microbiota among oviparous birds and lizards. *Biol. Let.*, 14(7): 20180225. doi: 10.1098/rsbl.2018.0225.

Ueda T., Yamada T., Hokuto D. i wsp. (2010) Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391:38–42. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.157

Viktorinová I., Henry I., Tomancak P. (2017) Epithelial rotation is preceded by planar symmetry breaking of actomyosin and protects epithelial tissue from cell deformations. *PLoS Genet.*, 13(11):e1007107. doi: 10.1371/journal.pgen.1007107.

Wells J.M., Spence J.R. (2014) How to make an intestine. *Development*, 141:752–60. doi: 10.1242/dev.097386

Yu L., Wang L., Chen S. (2010) Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell Mol. Med.*, 14:2592–2603. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x

Yui S., Nakamura T., Sato T. i wsp. (2012) Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult Lgr5^{+} stem cell. *Nat. Med.*, 18:618–23. doi: 10.1038/nm.2695

Zhang Y-G., Wu S., Xia Y., Sun J. (2014) Salmonella-infected crypt-derived intestinal organoid culture system for host-bacterial interactions. *Physiol. Rep.*, 2:e12147. doi: 10.14814/phy2.12147

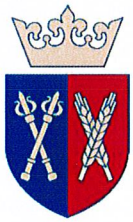
Źródło elektroniczne 1: Eurostat, 2017. [Online]. Dostępne (11.10.2018): https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agricultural_production_-_animals#Poultry

MAŁGORZATA PIERZCHALSKA

Chicken embryo intestinal organoids

The characterization of a new model and its application to study the impact of probiotics and Toll-like receptor ligands on the gut mucosa

Department of Food Biotechnology
Faculty of Food Technology
University of Agriculture in Kraków



Kraków, 2018

1. FULL NAME:

Małgorzata Pierzchalska

2. DIPLOMAS AND ACADEMIC DEGREES:

M.Sc. in Biology – Kraków, The Jagiellonian University, Faculty of Biology and Earth Sciences, Institute of Molecular Biology – 1990.
Thesis title: *The studies on the role of actin filaments in cell surface destabilization induced by hypertonic concentration of sodium chloride.* Supervisor: prof. dr hab. Włodzimierz Korohoda.

Ph.D. in Biology – Kraków, The Jagiellonian University, Faculty of Biology and Earth Sciences, Institute of Molecular Biology (discipline: molecular biology) – 25.11.1997.
Doctoral thesis title: *The studies on the influence of local anaesthetics on human skin fibroblasts in culture.*
Promotor: prof. dr hab. Włodzimierz Korohoda.

3. PREVIOUS AND CURRENT EMPLOYMENT IN SCIENTIFIC INSTITUTIONS:

- October 1990 – October 1991 – *Ph.D.* student, The Jagiellonian University, Faculty of Biology and Earth Sciences, Institute of Molecular Biology
- October 1991 – December 1997 – assistant, Kraków, The Jagiellonian University, Faculty of Biology and Earth Sciences, Institute of Molecular Biology, Department of Cell Biology,
- January 1998 – December 2006 – technical specialist – biologist, Kraków, Jagiellonian University Collegium Medicum, Faculty of Medicine, Department of Molecular Biology and Clinical Genetics,
- since December 2006 till present – assistant professor, Department of Food Biotechnology Faculty of Food Technology University of Agriculture in Kraków

4. INDICATION OF THE ACADEMIC ACHIEVEMENT

4.1 TITLE OF THE ACADEMIC ACHIEVEMENT

Chicken embryo intestinal organoids

The characterization of a new model and its application to study the impact of probiotics and Toll-like receptor ligands on the gut mucosa

4.2 SELECTED PUBLISHED STUDIES TO SUPPORT THE HABILITATION APPLICATION

The academic achievement consists of six publications which describe a model of intestinal organoids derived from late chicken embryo and the subsequent application of this model for research on intestinal physiology. Four of the publications are research articles published in journals indexed in Web of Science Core Collection, one is a review paper, and

one is a book chapter. The overall Impact Factor of these publications totals **11.941**. I am the first author in five of the publications, and I also acted as a corresponding author in all of them.

EXPERIMENTAL PUBLICATIONS:

PI. Pierzchalska M., Grabacka M., Michalik M., Żyła K., Pierzchalski P. (2012) Prostaglandin E_2 supports growth of chicken embryo intestinal organoids in Matrigel matrix. *Biotechniques,* 5: 307-315, DOI:10.2144/0000113851.
IF_{2012} **2.399**; points **25**; cited acc. to *WoS* - 9 (7 without self-citation); acc. to *Scopus* 12 times (9 without self-citation).

My contribution was about 75%. I put forward the main idea of the experiments. I carried out most of the experiments, wrote the first version of the manuscript, and prepared figures 1-3 as well as the final version of the text. The financial support for the study came from my research grant (Ministry of Science and Higher Education grant number N302 130834).

PII. Pierzchalska M., Panek M., Czyrnek M., Grabacka M. (2016) The three-dimensional culture of epithelial organoids derived from embryonic chicken intestine. In: Turksen, K. (ed.) *Organoids, Stem Cells, Structure, and Function*, series *Methods in Molecular Biology*, volume 1576 (Humana Press, Clifton, New Jersey, USA), DOI: 10.1007/7651_2016_15
Points **5.**

My contribution was about 70%. I wrote the first draft and the final version of the manuscript, and prepared figures 1-5. The research leading to the establishment of the protocol presented in the publication was mainly financed with funds of my research project (NCN 2013/09/B/NZ9/00285)

PIII. Pierzchalska M., Panek M., Czyrnek M., Gielicz A., Mickowska B., Grabacka M. (2017) Probiotic *Lactobacillus acidophilus* bacteria or synthetic TLR2 agonist boost the growth of chicken embryo intestinal organoids in cultures comprising epithelial cells and myofibroblasts. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.,* 53: 7-18, DOI: 10.1016/j.cimid.2017.06.002.
IF_{2017} **1.92**; points **25**; paper cited once acc. to *WoS*; acc. to *Scopus* - 5 times (4 without self-citation).

My contribution was about 70% – I formulated the scientific hypothesis and proposed the experimental scheme leading to its verification. I carried out 50% of experiments, analysed results, and wrote the manuscript. The financial support came from my research grant (NCN 2013/09/B/NZ9/00285).

PIV. Panek M., Grabacka M., **Pierzchalska M.** (2018) The formation of intestinal organoids in a hanging drop culture. *Cytotechnology,* 70:1085–1095, DOI: 10.1007/s10616-018-0194-8.
IF_{2017} **1.461**; points **20**; not cited yet acc. to *WoS*, acc. to *Scopus* - 2 (1 without self-citation).

My contribution was about 30% – I formulated the scientific hypothesis, and proposed the experimental scheme leading to its verification. I analysed results of all experiments, , and wrote the manuscript. The financial support came from my research grant (NCN 2013/09/B/NZ9/00285).

PV. Pierzchalska M., Panek M., Grabacka M. (2018) The migration and fusion events related to ROCK activity strongly influence the morphology of chicken embryo intestinal organoids. *Protoplasma,* DOI: 10.1007/s00709-018-1312-3 (in press).
IF_{2017} **2.457**; points **30**; not cited yet acc. to *WoS*.

My contribution was about 90% – I carried out most of the experiments, analysed recorded time-lapse films, wrote the manuscript, and prepared the figures. The financial support came from my research grant (NCN 2013/09/B/NZ9/00285).

REVIEW:

PVI. Pierzchalska M., Grabacka M. (2016) The potential role of some phytochemicals in recognition of mitochondrial damage-associated molecular patterns. *Mitochondrion,* 30:24-34, DOI:10.1016/j.mito. 2016.06.001.

IF_{2016} **3.704**; points $MNiSW_{2016}$ **30**; cited acc. *WoS* and *Scopus* – 1 (no self-citation).

My contribution was about 75% – I formulated the subject and the main idea of the review, analysed literature data, wrote about 75% of the first draft, and prepared final version of the manuscript.

4.3 DISCUSSION OF THE SCIENTIFIC AIMS OF THE AFOREMENTIONED STUDIES, THE RESULTS AND THEIR POTENTIAL APPLICATION

Animals and plants are living effects of Nature. Whence all of God is in all things (...). Think thus, of the sun in the crocus, in the narcissus, in the heliotrope, in the ***rooster****, in the lion.*

Giordano Bruno "The Expulsion of the Triumphant Beast"[1]

4.3.1 INTRODUCTION

In the recent years, the new technique of three-dimensional tissue culture models, called intestinal organoids or mini-guts, has profoundly changed the studies on mammalian gastrointestinal tract physiology. Such methods, however, have not been employed in the case of other vertebrates' cells and tissues. Before conducting the studies presented here, I formulated the research hypothesis that the epithelium derived from an avian intestine can be cultured in 3D, in the form of an organoid. The main object of following research was to verify this hypothesis by creating a new *in vitro* model of avian intestinal organoids. As a tissue source, I used a small intestine derived from late embryos of domestic chicken. The species of *Gallus gallus domesticus*, being a popular model animal in biological studies, is also of major importance for husbandry and food production.

The series of scientific publications presented here consists of research articles published in the period 2012-2018, which confirm the possibility of conducting chicken intestinal organoid culture. Moreover, I defined some differences between mammalian and chicken models, and presented some modifications and innovations introduced to the method of organoid culture. After establishing the method, the next step was to test its applicability for the research related to avian gut physiology. We hypothesized that activation of some Toll-like receptors (TLRs) by their specific ligands or the contact with probiotic bacteria may modulate the behaviour of organoids in the culture, by influencing cell proliferation or differentiation. We also investigated the changes in certain genes expression and in secretion of some inflammatory mediators by cells building organoid walls. Moreover, the TLR2 and TLR4 ligands and co-culture with probiotic bacteria were evaluated as potential factors influencing dynamic properties of organoids in the culture, *e.g.* fusion, rotation, and migration.

[1] G. Bruno (2005) The Expulsion of the Triumphant Beast, trans. A. D. Imerti, Lincoln: University of Nebraska Press.

Specific reasons for undertaking the presented studies

The cell culture methodology allows keeping cells and tissue alive after separation from a source organism. This powerful experimental tool, although widely used in biological studies for more than half of a century, is continuously changed and refined. Its contribution to the development of life sciences could not be overestimated. Moreover, cell culture techniques are broadly employed in many branches of applied research, for example in transplantology, diagnostics, cosmetology, food testing, veterinarian and husbandry studies. Recently, major progress has been achieved in three-dimensional organotypic culture techniques. The advances in the field led to establishing many new models of various tissues. In such models, cells are not attached to the flat surface of a culture dish bottom, but are grown in various protein or synthetic gels; alternatively, they can be kept in an environment composed of artificial or natural scaffolds. Another 3D culture methodology currently applied in many tests and experiments is based on the gravitational force keeping cells close one to another at the bottom of a "hanging" drop. In fact, the hanging drop culture is a special type of suspension culture (Mazzoleni et al. 2009). The specific conditions of both types of culture mentioned above are determined by three-dimensionality of the environment. As compared to the monolayer type, in two-dimensional cultures on plastic or glass, the cells have different access to such factors as nutrients, autocrine growth factors, oxygen, *etc.*, and develop interconnections that are more complex. Each cell has contacts not only with the neighbours around, but also with those below and above. Lately, the importance of the new techniques was emphasized by the editorial board members of journal "Nature" who distinguished "organoid culture" as the method of the Year 2017 (Kalabusheva et al. 2018).

In 3D culture conditions, the majority of noncancerous types of epithelial cells form conglomerates with fluid-filled lumens (spheres), called spheroids. Tumour cells, in such an environment, tend to form more solid, ball-shaped aggregates (micro-tumours). The development of 3D culture techniques has special impact on the studies on primary intestinal cells. The intestinal epithelium of mammals and birds is a monolayer covering both villus and crypts of Lieberkühn, with proliferation restricted to small area of crypts' bottom. The intestinal crypts form a niche for scarce stem cells, and consist of secreted progenitors of all types of cells present in intestinal epithelium. The brush border area contains millimetre-long protrusions, *i.e.* villi. In the villus base, the progenitors differentiate into absorptive enterocytes or other non-absorptive cell types (such as goblet and enteroendocrine cells, producing mucus and hormones). Differentiated cells migrate upwards to the villus tip, where they undergo apoptosis, and are constantly shed to the lumen. As a result, "new" epithelial cells replace the "old" ones with a speed incomparable to any other tissue of the body. The differentiation and migration cycle on the crypt-villus axis determines the proper function of the intestine as an organ of absorption, being at the same time an efficient barrier to the external world, and an immunological response modulator (Chin et al. 2016). This unique organization is a reason why, in order to maintain the primary intestinal epithelial cell culture, it is not enough to provide cells with a proper mixture of chemical factors. In order to keep these cultures alive and to preserve the stemness of some cells present in the initial preparation, one also needs to create the 3D environment with special biophysical properties. In other words, it is necessary to mimic the natural stem cell niche of intestinal crypts. This was the main reason why obtaining an

efficient customary long-life monolayer culture of cells originated from intestinal epithelium was a substantial challenge for many years.

A breakthrough came with the publication by Toshiro Sato et. al., who got an idea to embed isolated murine intestinal crypts in protein gel consisting of extracellular matrix proteins produced by Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma, composed of 60% laminin, 30% collagen IV, and 8% entactin (*i.e.* Matrigel™) – known to support spheroid cultures. When such cultures were fed with media containing R-spondin-1 (RSPO-1), Noggin (NOG), and Epidermal Growth Factor (EGF), spheroids were shortly formed and, after two or three days, the spheroids transformed into structures containing both crypt-like protrusions and villus-like areas between them (Sato et al. 2009, Sato and Clevers 2013). Such structures are called enteroids, and they can be obtained from small and large intestines of human and rodent newborn or adult animals. Moreover, enteroids were also successfully cultured from murine embryonic tissue (Mustata et al. 2013), and from human induced pluripotent stem cells. In the last case, it is possible to create organoids consisting not only of epithelial, but also mesenchymal cells. Such organoids, called iHIOs - induced human intestinal organoids (Finkbeiner and Spence 2013), resemble embryonic intestinal tissue (Wells and Spence 2014). Organoids were recently used as an *in vitro* model system in studies on intestine regeneration, transformation, metabolism, and intestinal cells - pathogens or commensals interactions (Finkbeiner et al. 2012, Zhang et al. 2014, Karve et al. 2017, In et al. 2016).

The species of *Gallus gallus domesticus* is one of the most important model organism in modern biology (Stern 2005), and its genome was sequenced as one of the first animal genomes (Hillier et al. 2004). It is worth noticing that over 20 billion chickens currently live on our planet (chickens outnumber humans by almost three times). The annual global poultry meat production exceeds 100 million tonnes, and eggs – 70 million tonnes (Mottet and Tempio 2017). Therefore, the interest in *Gallus gallus domesticus* as a subject of research is justified from the pragmatic point of view. It is particularly understandable in Poland, as our country is a leader in poultry meat production in Europe (acc. to Eurostat data from 2017, online source 1).

The previously known substantial differences in the development of gastrointestinal tract of birds and mammals indicated that the methods of mammalian organoids culture might not directly be applicable to chickens. Chickens are typical precocial birds, and have relatively mature guts at hatch. Moreover, in contrast to sterile new-borns of mammals, the gut bacterial colonization begins in an egg, few days before hatching (Trevelline et al. 2018). It was also shown that the proliferation of epithelial cells in young chicks is not restricted to the crypts, but dividing cells could also be found in the epithelium of villi (Roto et al. 2016). Taking into account all these facts, I decided that the development of 3D culture of chicken intestinal epithelium is the scientific task of high significance. The next step was to compare the chicken intestinal organoids cultures to equivalent mammalian models. In the course of chicken model characterization, I considered the organoid source (foetal vs. adult tissue), the method of culture establishment (in 50% Matrigel on porous membrane of inserts vs. in 5% Matrigel in hanging drops), and the media composition (*e.g.* addition of prostaglandin E_2 – PGE_2).

The beneficial impact of microbiome composition on gut physiology of both humans and domestic animals has been a subject of numerous medical and veterinarian research studies (Lutful Kabir 2009). These frequently suggest a profound role of commensals in intestinal epithelium homeostasis, and for the whole organism immunity (Pott and Hornef 2012). What

is more, the changes in microbiota are believed to contribute to pathogenesis of many diseases with both infectious and autoimmunological background, or even cancerogenesis (Sommer and Bäckhed 2013). Probiotics have been considered a healthy component of food and feed for dozens of years. Recently, they are also suggested as an add-on therapeutics both in medicine (Markowiak and Śliżewska 2017) and veterinarian treatment regimes (Markowiak and Śliżewska 2018). However, the mechanism of probiotics' action and their effectiveness are still a subject of scientific debate. The rationale behind the use of probiotic bacteria in treatment and prophylaxis is partly that probiotic bacteria, as many other microorganisms, are the potential source of various TLR ligands. They could be, in some circumstances, the factors actually supporting mucosal homeostasis by activating cell proliferation and stimulation of immunological responses (Abreu 2010).

The experimental and epidemiological data indicate that the disturbance in the microbiota - host cells interaction contributes to some human pathologies, such as inflammatory bowel disease (Round and Mazmanian 2009), or necrotizing enterocolitis of new-borns (Ganguli et al. 2013), and animal diseases (*e.g.* necrotizing colitis of chicks) (Jayaraman et al. 2013). The probiotic use may be of special significance in the current poultry industry. Management of many young animals in a small crowded space, lack of contacts between eggs or chicks and hen-mother microbiota, lack of food supply immediately post-hatch – all these facts negatively affect the development of birds' immunity, and increase the risk of dangerous infections spread. These can pose risk to the health of both animals and the potential consumers of chicken meat. Having all these facts in mind, I undertook some studies on the influence of probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus* on cells of chicken organoids in a co-culture system.

Animals identify pathogens and commensal microorganisms, and react to their presence, because they express the receptors capable of recognizing and evaluating them on the surface of many types of cells. Toll-like receptors are proteins belonging to the family of receptors recognizing microbe-associated molecular patterns (MAMPs), they are also activated by ligands originated from damaged or dead cells (damage associated molecular patterns, DAMPs), (Yu et al. 2010). However, it is very likely that, from the evolutionary point of view, the first role of Toll-like receptors was to regulate cell differentiation (Rakoff-Nahoum and Medzhitov 2008). In mammalian intestine, the expression of these receptors is high in undifferentiated cells of the crypts, and low in differentiated enterocytes; it is also higher in new-borns and young animals (or children), as compared to adult animals (or adult human beings). Cellular compartmentalization is also a very characteristic feature of these receptors . Some TLRs (including lipopolysaccharide [LPS] receptor – TLR4) are only present on the basolateral but not on apical cell membranes[i]. As a consequence, the TLRs activation leading to the expression of proinflammatory genes is only possible in the case where the bacteria cross the epithelial barrier due to injury or active transport (by dendritic cells). It is believed that the TLR2 activation – when it eventually happens – causes the secretion of prostaglandin E_2 (PGE_2) by epithelial cells, which stimulates their proliferation. Recently, it has also been shown that *Lactobacillus* protects the intestinal epithelium against radiotherapy-induced injury, which effect is not observable in TLR2 knockout mice (Ciorba et al. 2012). Yet another published paper indicated that the activation of TLR4 by bacterial lipopolysaccharide prevents proliferation and activates apoptosis in murine intestinal enteroids (Neal et al. 2012). Therefore,

the relationship between various TLR activation and intestinal epithelial stem cells' behaviour is still an open question.

Furthermore, it is not known what kind of relationship exists between TLR activation and epithelial cells proliferation in avian intestine, where cells maintain the ability to proliferate outside intestinal crypts for much longer versus to mammals. This is why I carried out some series of experiments in which the chicken intestinal organoids were stimulated with synthetic lipopeptide (P3CSK4, ligand of TLR2) or lipopolysaccharide from pathogenic strain of *Escherichia coli* (LPS, ligand of TLR4). The results are a proof that the chicken organoids model may be productively used in research on specific aspects of avian gut mucosa biology.

4.3.2 Description of the results presented in publications supporting habilitation application

Chicken intestinal organoids culture

The first publication summarizes the studies undertaken in the course of my research project *The model of differentiated chicken intestinal epithelium as a tool for the evaluation of immunomodulatory role of the intestinal mucosa* (2008-2011, grant funded by the Polish Ministry of Science and Higher Education, number N302 130834). The main aim of the project was to establish the method of effective culture of chicken intestinal epithelial cells. My first attempts focused on the isolation of intestinal cells from embryonic chicken small intestine (from 18 to 20-day-old embryos) while preserving their proliferation potential. We tested various methods of intestinal lining isolation by incubation of intestine fragments (extracted and opened longitudinally) in saline containing calcium chelating agents in various concentrations (for periods of 0.5-2 hours). As we aimed for choosing proper milieu for tissue fragments embedding and media composition, we tested various Matrigel:cell suspension proportion and such media addition as EGF, RSPO-1, NOG and PGE_2. Eventually, we chose the conditions for the culture, similar but not identical to those proposed for murine organoids (Sato et.al. 2009), which sustain viability and chicken intestinal epithelial cell proliferation for as long as four weeks.

In our publication in *Biotechniques,* we showed that chicken intestinal organoids could be cultured without RSPO-1 and NOG when 5 μg/ml of PGE_2 is added to the medium instead. We also provided evidence that organoids contain cells that express markers of differentiated enterocytes. The activity of sucrose-isomaltase enzyme was measured by biochemical methods in live but disrupted organoids. We also checked the transcripts level of homeotic genes *cdxA* and *cdxB* in organoids, and found out that the level of *cdxA* transcripts is higher in both PGE_2 and RSPO-1/NOG treated culture as compared to cultures in media without the addition of these factors (*v.* PI). It was important in view the fact that cdxA is considered to be the avian homolog of mammalian *caudal-related homeodomain protein 2 (cdx2) gene* – which is the main homeotic gene responsible for embryonic intestine development (Chin et al. 2016). The silencing of this gene in murine embryonic cells of intestinal lineage was shown to prevent correct development of mature intestine (Grainger et al. 2013). We also showed the presence of epithelial cells and intestinal progenitors and enterocytes markers (cytokeratin, villin) in whole protein organoid isolates by immunoblotting. The structure of organoids was visualized by histological staining of thin organoids section , which proves that they consist of monolayer walls covering an open lumen filled with fluid and dead cells remnants.

The method and its modifications were described in a more comprehensive way in the chapter of the book entitled *Organoids, Stem Cells Structure, and Function*, published in the series "Methods in Molecular Biology". The text presents some results of experiments on the influence of chicken serum addition to the organoids media. It was demonstrated that a small amount (below 1%) of chicken serum boosts organoids growth, in contrast to foetal calf serum, which slows it down. It was also illustrated how the morphology of the culture changes with the increase of tissue fragments amounts present in the initial suspension. It is possible to create a culture where not only spherical organoids, but also tubular elongated and branched structures are formed. The text also discussed the amount of myofibroblasts in chicken embryo organoid culture, and their potential origin. It was emphasized that, in cultures originated from adult chicken intestine, the myofibroblasts are very rarely visible. In organoids originated from embryonic tissue, myofibroblasts are most frequently spotted in close proximity to epithelial walls of particularly large organoids, which points to their supporting role and to the existence of a functional unit comprising cells with both epithelial and mesenchymal characteristics (*v.* PII). The amount of the myofibroblast marker (α-smooth muscle actin – αSMA) in the culture increases with time, as was shown by immunoblotting *(v.* PIII*)*. We suspect that the interaction between these two types of cells enhance the cultures' viability. Other authors also reached the same conclusion; for example, it was shown that the enteroids originated from murine embryos cultured with collagen gels are accompanied by proliferating fibroblasts (Ootani et al. 2009, Lahar et al. 2011).

The studies on the impact of some TLR ligands on organoids in the culture.

One of the main aims of my following research project financed by OPUS program of the Polish National Science Centre (2013/09/B/NZ9/00285) was to verify the hypothesis that activation of TLR4 and TLR2 by their specific ligands is able to influence organoids growth in the culture. At the beginning of this research, we carried out a series of initial experiments to establish the optimal way of TLR ligands addition to the organoids culture. As a result, it was decided that highly purified lipopolysaccharide from pathogenic strain of *Escherichia coli* O111:B4 or synthetic lipopeptide (N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2R,S)-propyl]-(R)-cysteinyl-seryl-(lysyl)3-lysine, Pam3CSK4) will be added to the Matrigel to tissue suspension mixture at the moment of culture establishment (time 0). In the same mode as ligands, the live probiotic bacteria of *Lactobacillus acidophilus* LA5 were added to the organoids culture. The presence of bacteria in the organoids lumen was confirmed by fluorescence microscopy. We analysed organoids morphology on Day 2 and Day 4 of the culture. While applying this experimental scheme, we observed the following phenomena:

1) Pam_3CSK_4 in a concentration of 2 μg/ml stimulated growth of organoids, as the proliferation of cells in organoids wall increased, and so did the parameters describing organoids number, size, and morphology. It was accompanied by the increase in secretion of prostaglandins and expression of TLR2.1 (TLR2.1 is one of two chicken TLR2 homologs) and TLR4 receptors (*v.* PIII). The TLR4 ligand, LPS, also stimulated the growth of organoids as, after 3 days of culture, the mean organoids area was enlarged versus organoids in unstimulated culture. The ligand of TLR4 – lipopolysaccharide (LPS, from *Escherichia coli* O111:B4, 1 μg/ml) seemed to work at the same mode but its influence on the parameters describing organoids morphology was weaker in comparison to Pam_3CSK_4 (*v.* PIII and PV).

2) The co-culture of organoids with probiotic bacteria stimulated organoids growth; these conditions also enhanced the expression of mRNA for TLR2.1 (*v.* PIII).

The key role of PGE_2 in preserving the activity of WNT signalling by enhancing phosphorylation of β-catenin is the well-established phenomenon in mammalian cells (Goessling et al. 2009), and the addition of this prostanoid favours reprograming of epithelium to induce regeneration. (Miyoshi et al. 2017). As I demonstrated, it also stimulates growth of chicken embryo organoids in Matrigel. We also undertook the efforts to assess the amount of two major prostaglandins and their derivates (PGE_2 and PGD_2) in conditioned media collected from organoids culture. It turned out that organoids cells produced substantial amounts PGE_2, but comparable amounts of PGD_2 can be found in supernatants. In the first two days, the proportion of PGE_2 to PGD_2 was about 8 to 3, but it changed to 6 to 5 in next two days. We confirmed the presence of enzymatic conversion of both prostaglandins (13,14-dihydro-15-keto PGE_2; 13,14-dihydro-15-keto PGD_2), and the presence of PGA_2, which is the product of nonenzymatic transformation of PGE_2. Myofibroblasts produce ten times more of PGD_2 then PGE_2, and the products of enzymatic conversion of these prostanoids are absent in myofibroblasts conditioned medium. The increase PGD_2 production in „older" organoids could be an effect of myofibroblasts overgrowth. Stimulation with Pam_3CSK_4 enhanced synthesis of both measured prostaglandins (*v.* PIII).

Organoids in a hanging drop culture

What will happen if the isolated fragments of embryonic epithelium, capable of generating organoids in Matrigel, are cultured in a "hanging drop"? To answer this question, we introduced a drop (50 μl of cell suspension containing 5% of Matrigel) to the special microplate design for hanging drop culture (96-well *Perfecta3D Hanging Drop Plate* produced by 3D Biomatrix, Ann Arbor MI, USA). We observed that, in such conditions, the organoids are formed on Day 4 of culture when the "intestinal organoid" media are used. The hanging drop technique is one of the oldest method in cell biology. It recently drove more attention due to the development of a new culture of micro-tumors (Kuo et al. 2017, Asghar et al. 2015) and microorgans in "hanging drop" plates (Figtree et al. 2017, Lin et al. 2016), and their use in high-throughput tests in biology and diagnostics. A Ph.D. student in our research team, Małgorzata Panek (Gawin), was mainly in charge of this chain of experiments. We conducted a comparison of morphology between organoids formed in the hanging drop *vs.* those embedded in Matrigel. Generally, the three-dimensional structures in both culture conditions are quite similar. The cultures obtained in hanging drops are equally dynamic, individual organoids are growing, and, consequently, the whole appearance of the compact structure changes in time. Organoids in hanging drops, due to gravity force acting on them, are in very close proximity, so the fusion events are even more possible, and the structures eventually formed are more compact and larger, composed of many contiguous organoids. A small but clearly visible fraction of proliferating epithelial cells was observed in the "hanging" organoids wall. The expression of markers of differentiated epithelial cells (sucrase-isomaltase), progenitors (villin), and stem cells (Lgr5) were confirmed by immunoblotting. The transcripts of *cdxA*, *cdxB*, and *sox-9* were also present in both WNT3a-treated and untreated "hanging" organoid cultures. Interestingly, myofibroblasts, usually present in the chicken intestinal embryo organoids embedded in extracellular matrix, were very rarely spotted in the hanging drop culture, which finding was confirmed by immunoblotting analysis (*v.* PIV).

The hanging drop culture possesses some important advantages over the previously used method of immersing organoids in a Matrigel layer. Firstly, in comparison to standard culture in Matrigel, the hanging drop technique allows cost reduction due to smaller quantity of culture media and Matrigel used. Secondly, the procedure of seeding cells is quicker due to skipping of a Matrigel solidification step. When organoids are cultured in Matrigel, they have to be released from the protein scaffold before most of biochemical analyses are performed. In a hanging drop, this long step is bypassed, as just 5% addition of that basement membrane matrix does not cause medium jellification. This media has also more defined characteristics and the experimental bias because possible heterogeneity in Matrigel batches is less noticeable. The disadvantages of such cultures can also be named, *e.g.* the tiresome and time-consuming procedure of media exchange, difficulties with conducting microscopic observation of organoids, and the requirements of special "hanging drop" cell culture plates. The applicability of hanging drop techniques for organoids research will be probably verified in future research.

In the next publication of the series of articles supporting my habilitation application, I focused on the dynamic features of organoids, usually neglected by others using this model in their research. It all started with an observation that embryonic intestinal chicken organoids comprised of epithelial cells and myofibroblasts are able to reshape, rotate, migrate, and fuse with one another (*v.* PV). So far, only few publications marginally deal with dynamic properties of organoids, pointing to the possibility of organoids fusion (Jabaji et al. 2014, Sachs et al. 2017) and rotation (Viktorinová et al. 2017). The directional migration of organoids has not been described so far. Such observation was done in the case of chicken organoids due to the method of time-lapse video recording and microscopic image analysis of first four days of organoid culture. The most important part of the publications are time-lapse films attached to the manuscript electronic version as files in .avi format (*v.* PV, supplementary materials). Organoids cultures were kept in a special chamber mounted on Zeiss Axiovert Z1 inverted microscope at constant temperature (37°C) and carbon dioxide level (5%). The cultures were photographed every 30 minutes to visualize the process of spheroids formation. The epithelial fragments closed up in first hour and, in next 12 hours of culture, organoids covered with epithelial cells and fluid-filled lumens were formed. In the second day of culture, the myofibroblast population became visible, and their contractile activity seemed to affect both organoids shape and the structure of the environment. With time, the lumen became full of dead cell debris and, as a consequence, organoids can rapture.

However, the most surprising phenomenon discovered during the analysis of the recorded films was the movement of organoids. Generally, organoids of more regular shapes resemble spheres, rotate intensively, and the direction of rotation can change. Organoids of more irregular, elongated morphology can migrate through Matrigel with a speed of 300 micrometres per day. As a result of enlargement and migration, organoids can collide and, eventually, fuse one with another. In the discussion of these results, I argue that this dynamic behaviour of organoids is an example of collective cell movement. The mechanism of such type of movement in other biological models was the subject of a few research studies, but it is not entirely understood yet. As far as chicken intestinal organoids are concerned, we tested the influence of *Rho-associated coiled coil-containing protein kinases* (ROCK) inhibition on organoids migration. We observed that addition of specific inhibitor of ROCK, Y27632, resulted in the formation of organoids of smaller size and, simultaneously, the number of

spotted fusion events was lower when compared to cultures without the inhibitor. However, the complete inhibition of directional movement does not occur in these circumstances. Therefore, we hypothesize that, in the case of chicken intestinal organoids, ROCK inhibition diminishes organoids merging rather than collective cell movement. We have also concluded that the dynamic properties of organoids could not be neglected in study design when the impacts of biologically active compounds or some microorganism species on organoids morphology are to be evaluated.

The series of publications supporting the habilitation application contains a review article written for the "Mitochondrion" journal. I have chosen the subject having in mind my future research project I plan to conduct with the use of the intestinal organoids model. In my plans, I have also taken into account scientific interests of my colleagues and myself, which focused around subject of metabolism, dietary biochemicals, and TLR signalling pathway crosstalk. In this text, we try to look at bioactive compounds from food (*e.g.* sulforaphane and curcumin), which can affect the response of cells from intestinal mucosa to TLR activation. The subject is important as many of TLR ligands originating from damaged mitochondria (powerful *damaged associated molecular patterns* – DAMPs) are strongly proinflammatory, and some food ingredients have become recently very popular due to their potential anti-inflammatory activity *(v. PVI)*. Short mtDNA fragments containing unmethylated CpG have a potential to activate TLR9 receptor. One of the polymorphisms of this receptor is correlated with some gut diseases of immunological background, and severity of gastrointestinal tract infections caused by *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* or *Helicobacter pylori.* In the review, I also point to the facts confirming the connections between the intestinal and airway mucosa homeostasis and TLR9 activation. At the same time, we hypothesize that there could be a crosstalk between the action of mtDAMPs and the action of phytochemicals of not fully understood anti-inflammatory properties. We plan to test this connection existence using the *in vitro* model of intestinal organoids.

4.3.3 Discussion of potential application of the results included in the academic achievement

My investigation on chicken intestinal organoids as model system can be seen as part of a broader tendency in biomedical studies – to substitute experiments done on 2D cell cultures with experiments using 3D organotypic models. This is based on a general notion that the 3D culture conditions mimic better the environmental conditions encountered by cells *in vivo*.

The search in the *PubMed* database for "intestinal organoids", enteroids, or colonoids yield 435 records, of which 413 published in the last five years. Only two of all these publications, however, (excluding five from our laboratory) use avian organoids as a research model (Li et al. 2018, Powell and Behnke 2017). Both of them cite our publication (*PI*). We hope that our improved model will be used in future research on avian gut physiology and immunology. It is also possible that it will draw attention of people interested in poultry husbandry who want to test the influence of various feed additives on health and immunity.

The hanging drop culture of intestinal organoids is our original idea that can be used also for mammalian tissue culture. So far, only one paper reported the successful culture of induced-gut (i-gut) in hanging drop, but the structure originated form mouse stem cells (Ueda et al. 2010). Until now, the method was not used for culture of any organoids derived from

crypts or LGR5 positive cells. We suppose, it is possible also for mammalian systems [results of our preliminary studies were published as conference abstract (Gawin et al. 2016)]. In this context, we believe that this type of organoid culture will be used in experiments aiming at throughput and quick testing of drugs or food components.

Although many authors pointed to the role of PGE_2 in intestinal stem cells' fate, nobody analysed the profile of prostanoids produced by intestinal organoids in culture. Showing that organoids produce substantial amounts of PGD_2 should draw attention to the role of this metabolite of arachidonic acid in intestinal mucosa homeostasis, and stimulate research on the role of prostaglandins in the intestinal stem cells niche. It can open a novel path in research on pathogenesis of some gut diseases, both of humans and animals.

The background of collective cell movement is not entirely understood, and it is of great interest for mechanobiology. The research in this field has become easier with growing availability and popularity of 3D cell culture. Nevertheless, many methodological challenges remain. The studies on the dynamic properties of organoids seem to be important in the context of future therapeutic use of organoids transplantation to the damaged gut (Yui et al. 2012). This also creates new possibilities in the studies on mechanisms of embryonic gut development (where chicken embryo is the popular research model) and on cancerogenesis and metastasis formation, as collective cell movement plays a key role in these processes.

4.3.4. Conclusions

The results of publications supporting my habilitation application are based on my original ideas, and represent a coherent approach to the subject of chicken intestinal organoid model and its application for research in avian physiology (Figure 1). I believe that the development and characterization of chicken "mini-guts" will allow us to conduct some other research on the role of bacterial colonization in intestine maturation and homeostasis in the future. The method of intestinal organoids culture in hanging drop can be potentially applied to organoids or murine or human origin – which we are currently testing. In my future research, I will focus on the comparison between the reaction of avian and mammalian intestinal mucosa on various Toll-like receptors activation using intestinal organoids culture as an *in vitro* model system of intestinal epithelium development and regeneration.

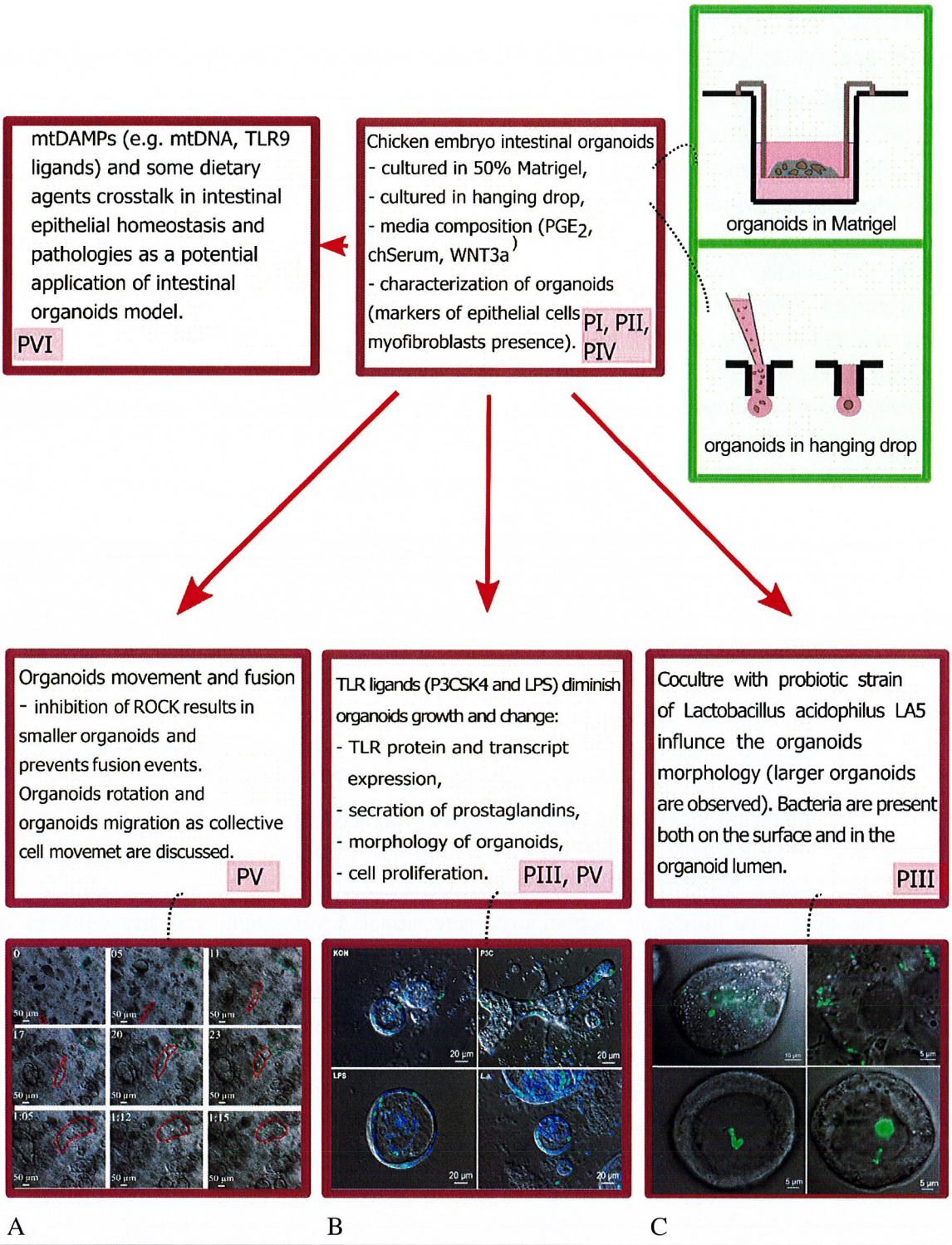


Figure 1. Results of publications supporting habilitation application - graphical summary.
Panel **A** shows dynamic nature of organoids culture. In upper left photo corners time of culture (day:hour). Two individual organoids outlined with red and green, mowe and eventually fuse with each other. Panel **B** – nucleoi characterize by green fluorascence belong to proliferating cells (organoids cultured without TLR ligands (KON), incubated with TLR2 ligand (P3CSK4, 2 μg/ml) or TLR4 ligand (LPS, 1 μg/ml); organoids cultured with live probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* LA5 (*L.a.*). Panel **C** – organoids cultured with live probiotic bacteria *Lactobacillus acidophilus* LA5. Bacteria are situated both in the inside (in the lumen) and outside (attached to the surface) of organoids.

5. OTHER ACADEMIC ACHIEVEMENTS

5.1. PUBLICATIONS OTHER THAN THOSE SPECIFIED AS THE BASIS FOR HABILITATION APPLICATION

My accomplishments are connected with various scientific fields. The subjects of my previous research did not result from my own interests only, but also from the interests of my mentors and colleagues whom I met during my career.The first eight years of my work as a researcher took place in the Institute of Molecular Biology of the Jagiellonian University, where, in the Department of Cell Biology then directed by prof. Włodzimierz Korohoda, I prepared my Master of Science thesis and *Ph.D.* dissertation. This intellectually inspiring scientific environment ideally matched my interests in the cell mechanobiology, the cytoskeleton structure, and the methods of primary cell culture. During this fruitful time, I acquired skills in biological experiments setting, analysis of experimental results, the cell culture, and fluorescence microscopy. As my *Ph.D.* project, I choose the subject partly related to cell biology, partly to medical biology – "the influence of some local anesthetics on cell cytoskeleton of eukaryotic cells in culture". The study results were published in following papers:

1. Wodnicka M., **Pierzchalska M.**, Bereiter-Hahn J., Kajstura J. (1992) Comparative study on effects of cytochalasins B and D on F-actin content in different cell lines and different culture conditions. *Folia Histochem. Cytobiol.*, 30(3), 107-11.
2. Korohoda W., Michalik M., **Pierzchalska M.** (1994) Benzamide-induced changes in the actin cytoskeleton in human skin fibroblasts. *Cell. Biol. Int.*, 18(8): 791-6.
3. Michalik M., **Pierzchalska M.**, Pabiańczyk-Kulka A., Korohoda W. (2003) Procaine-induced enhancement of fluid-phase endocytosis and inhibition of exocytosis in human skin fibroblasts. *Eur. J. Pharmacol.*, 475(1-3): 1-10.
4. **Pierzchalska M.**, Michalik M., Stępień E., Korohoda W. (1998) Changes in morphology of human skin fibroblasts induced by local anaesthetics: Role of actomyosin contraction. *Eur. J. Pharmacol.*, 358(3): 235-44.

The next very important step in my professional development was my work in the research team established by professor Andrzej Szczeklik at the Department of Internal Medicine of the Jagiellonian University Collegium Medicum. As a member of the group investigating bronchial asthma biology, I organized the cell culture laboratory, and then started to build up the bank of cells isolated from tissue fragments collected during bronchoscopy from the bronchi of asthmatic patients. As a part of the training in asthma biology, I was a beneficiary of two scholarships which allowed me to undergo training in the leading asthma laboratories in England (at the Imperial Collage of London and at the University of Southampton). Due to knowledge and skills I gained there, I was able to successfully culture cells originated from human bronchi (epithelial cells and fibroblasts). The introduction of methods of these cell cultures created an opportunity to conduct experiments oriented at the comparison between some features of cells derived from atopic asthmatics, aspirin asthmatics, and nonastmatic subjects *in vitro*. The aim of this study was to unveil the aetiology of bronchial asthma with special relevance to asthma with aspirin sensitivity. During this time, I also became interested in the biological role of prostanoids – important tissue hormones and mediators of inflammation (*e.g.* cysteinyl leukotrienes, prostaglandins, and lipoxins) in bronchial asthma. In three publications connected to this subject, I conducted the majority of experiments and was named as the first author. Until present, those articles have been cited over 150 times, which suggests

that the results of my experiments were noticed and drew attention of researches interested in bronchial asthma biology:

1. **Pierzchalska M.**, Mastalerz L., Sanak M., Zazula M., Szczeklik A. (2000) A moderate and unspecific release of cysteinyl leukotrienes by aspirin from peripheral blood leucocytes precludes its value for aspirin sensitivity testing in asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 30(12): 1785-91.
2. Sanak M., **Pierzchalska M.**, Bazan-Socha S., Szczeklik A. (2000) Enhanced expression of the leukotriene C_4 synthase due to overactive transcription of an allelic variant associated with aspirin-intolerant asthma. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 23(3): 290-6.
3. Mastalerz L., Niżankowska E., Sanak M., Mejza F., **Pierzchalska M.**, Bazan-Socha S., Bestyńska-Krypel A., Ćmiel A., Szczeklik A. (2002) Clinical and genetic features underlying the response of patients with bronchial asthma to treatment with a leukotriene receptor antagonist. *Eur. J. Clin. Invest.*, 32(12): 949-55.
4. **Pierzchalska M.**, Szabó Z., Sanak M., Soja J., Szczeklik A. (2003) Deficient prostaglandin E_2 production by bronchial fibroblasts of asthmatic patients, with special reference to aspirin-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 111(5): 1041-8.
5. **Pierzchalska M.**, Soja J., Woś M., Szabó Z., Niżankowska-Mogilnicka E., Sanak M., Szczeklik A. (2007) Deficiency of cyclooxygenases transcripts in cultured primary bronchial epithelial cells of aspirin-sensitive asthmatics. *J. Physiol. Pharmacol.*, 58(2): 207-18.

In the years that followed, I continued my work connected to asthma pathophysiology, participating in the research (coordinated by Marta Michalik or Jarosław Czyż of the Jagiellonian University, and Marek Sanak of the Jagiellonian University Collegium Medicum) on the involvement of the process of fibroblasts to myofibroblasts transition in airway remodelling. The results of the studies were published in papers listed below:

1. Michalik M., **Pierzchalska M.**, Legutko A., Ura M., Ostaszewska A., Soja J., Sanak M. (2009) Asthmatic bronchial fibroblasts demonstrate enhanced potential to differentiate into myofibroblasts in culture. *Med. Sci. Monit.*, 15(7): BR194-201.
2. Michalik M., **Pierzchalska M.**, Włodarczyk A., Wójcik K.A., Czyz J., Sanak M., Madeja Z. (2011) Transition of asthmatic bronchial fibroblasts to myofibroblasts is inhibited by cell-cell contacts. *Respir. Med.*, 105(10): 1467-75.
3. Michalik M., Soczek E., Kosińska M., Rak M., Wójcik K.A., Lasota S., **Pierzchalska M.**, Czyż J., Madeja Z. (2013) Lovastatin-induced decrease of intracellular cholesterol level attenuates fibroblast-to-myofibroblast transition in bronchial fibroblasts derived from asthmatic patients. *Eur. J. Pharmacol.*, 704(1-3): 23-32.
4. Paw M., Borek I., Wnuk D., Ryszawy D., Piwowarczyk K., Kmiotek K., Wojcik-Pszczoła K.A., **Pierzchalska M.**, Madeja Z., Sanak M., Błyszczuk P., Michalik M., Czyż J. (2017) Connexin43 controls the myofibroblastic differentiation of bronchial fibroblasts from patients with asthma. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 57(1): 100-10.

In 2006, I started to work at the University of Agriculture in Kraków, at the Faculty of Food Technology, Department of Food Biotechnology. In collaboration with dr Maja Grabacka we decided to undertake some efforts aimed at strengthening the research capacity of our laboratory by organization a unit for cell and tissue culture. In 2012, it was further expanded, as we managed to equip it with a modern fluorescence microscope (Zeiss Axio Observer Z1) with Apotome™ and the heating, and CO_2 influx modules designed for live cells observation. It allowed us to carry out experiments in which time-lapse video recording of cells in culture, advanced microscopic techniques, and microscopic image analysis are essential, including the experiments on chicken intestinal organoids. The equipment was also used in research projects

coordinated by my co-workers. Some of these studies involved bioavailability of inositol phosphates of bread supplemented with phytases. The effect was investigated with the use of common cell culture model of differentiated Caco-2 cells, and results were reported in following publications:

1. Duliński R., Cielecka E.K., **Pierzchalska M.**, Byczyński L., Żyła K. (2016) Profile and bioavailability analysis of myo-inositol phosphates in rye bread supplemented with phytases: A study using an in vitro method and caco-2 monolayers. *Int. J. Food. Sci. Nutr.*, 67(4): 454-60.
2. Duliński R., Cielecka E.K., **Pierzchalska M.**, Żyła K. (2015) Phytases improve myo-inositol bioaccessibility in rye bread: A study using an *in vitro* method of digestion and a Caco-2 cell culture model. *Food Technol. Biotechnol.*, 53(1): 66-72.

At the same time, I was engaged in some research project coordinated by the head of the Department I worked in, professor Krzysztof Żyła. His main scientific interests are the enzymatic conversion of phytates from food or feed, and the biological role of inositol and its phosphates. The publications on this subject that I co-authored are:

1. Zyła K., Grabacka M., **Pierzchalska M.**, Duliński R., Starzyńska-Janiszewska A. (2013) Effect of inositol and phytases on hematological indices and α-1 acid glycoprotein levels in laying hens fed phosphorus-deficient corn-soybean meal-based diets. *Poult. Sci.*, 92(1): 199-204.
2. Zyła K., Duliński R., **Pierzchalska M.**, Grabacka M., Józefiak D., Świątkiewicz S. (2013) Phytases and myoinositol modulate performance, bone mineralization and alter lipid fractions in the serum of broilers. *J. Anim. Feed Sci.*, 22(1): 56-62.

Within the framework of the projects directed by my co-worker, dr Maja Grabacka, in collaboration with professor Krzysztof Reiss from *Louisiana Cancer Research Center*, New Orlean, USA, I took part in studies on the peroxisome proliferators activated receptors α role in cancer cell metabolism and physiology. The experimental and review publications related to this topic are listed below:

1. Grabacka M., **Pierzchalska M.**, Reiss K. (2013) Peroxisome proliferator activated receptor α ligands as anticancer drugs targeting mitochondrial metabolism. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 14(3): 342-56.
2. Grabacka M., **Pierzchalska M.**, Dean M., Reiss K. (2016) Regulation of ketone body metabolism and the role of PPARα. *Int. J. Mol. Sci.*, 17(12): 2093.
3. Grabacka M., Wilk A., Antonczyk A., Banks P., Walczyk-Tytko E., Dean M., **Pierzchalska M.**, Reiss K. (2016) Fenofibrate induces ketone body production in melanoma and glioblastoma cells. *Front. Endocrinol.*, 7: 5.

In another review written together with Maja Grabacka, we analysed the influence of some phytochemicals on mitochondria in the context of carcinogenesis:

Grabacka M., Gawin M., **Pierzchalska M.** (2014) Phytochemical modulators of mitochondria: The search for chemopreventive agents and supportive therapeutics. *Pharmaceuticals* 7(9): 913-42.

5.2. Teaching and other professional activities related to the development of my research

During most of my career, I have worked not only as a researcher, but also as a university teacher. I have always taken efforts to closely link my activities in the areas of science and teaching. In my opinion, the contact with students and younger researchers is the best way to find motivation to constantly improve the knowledge in such quickly developing scientific

fields as cell and molecular biology. Before I got my *Ph.D.*, I was involved in teaching cell biology and modern methods in molecular biology to biology students at the Jagiellonian University. At the University of Agriculture in Krakow, I was fully responsible for the preparation and conducting of a course in Animal and Plant Cell Physiology for food technology students (30 hours of lectures and 45-60 hours of practical classes). I am also actively involved in teaching biochemistry, enzymology, modern methods in food biotechnology, and bioethics. I have also gathered some experience in teaching other university teachers within the framework of the intensive course organized in 2014 for food technology teachers from the University of Technology in Bauchi, Nigeria. An important part of my teaching activity is formed by supervision of students in biotechnology or food technology during their work on their diplomas or master theses. In last years, I supervised 24 Engineer diplomas and 18 Master of Science theses .

Nowadays, a major part of scientific activities involves promotion of research results at meetings and conferences all other the world. Such events are important for developing international cooperation by establishing valuable relations with other scientists in the field. It is why I presented my work in the form of lectures or posters at over 30 international meetings or symposia, receiving awards for the best poster presentation (III European Asthma Congress, in Athens, 2005), and for the best oral presentation (XIX International conference: "Risk factors of food chain", in Mátrafüred, Hungary, 2018). Moreover, I have also always taken an opportunity to attend courses and training organised by scientific organizations (*e.g.* EMBO, FEBS, POLlasa), or biotech companies. Detailed information on this sort of my activities have been listed in Attachment 4.

I have been active in the field of science popularization by writing some articles on contemporary biological breakthroughs for one of the most popular and influential Polish weekly magazines, *Polityka*. I have also participated in the events organized by the University of Agriculture in Krakow, open to general public, such as *Night of Scientists* or *Youngsters' University.*

My administrative duties include participating in the Faculty Commission for Scientific Development (since 2014 till present). One of the tasks of this commission is to provide opinion on the young scientists' applications for grants and on their PhD projects. For me, it is a valuable opportunity to become acquainted with a broad range of subjects of research carried out by other members of the Faculty. In the period 2007 - 2008, I acted as a secretary of Admission Commission at the Faculty of Food Technology.

My other achievements include the organization of the microscopy laboratory for the Department of Food Biotechnology, which was established in 2012. I was responsible for the drafting of a successful grant proposal for the Ministry of Science and Higher Education, and next for the tender documentation for inverted fluorescent microscope, equipped with the unit allowing live observation of cells in culture and time-lapse video recording. I was also involved in the laboratory space laoyout arrangement, cooperation with the staff of the University Administration from Property and Financial Departments, as well as the sales representatives during the microscope purchase process and subsequent training and operation of the equipment. Now, I am responsible for all activities and research performed in the microscopy laboratory, supervising and helping my colleagues who use this equipment in their projects.

I also devote some of my free time to voluntary work for the scientific community by participating in the peer-review process for various journals indexed in Web of Science and by being my Faculty representative in the University Commission of one of two trade-union organizations at the University of Agriculture in Kraków.

6. CONCLUDING REMARKS

The fields of my scientific work have varied throughout my professional career, but my interests remain mainly unchanged since the time I graduated from my biological studies. My publications, presented as a bibliometric summary in Table 1, have frequently balanced on the edge between biology and biotechnology, medicine and food sciences. Nevertheless, I have always been interested in such phenomena and processes as mechnobiology on cellular level, cytoskeleton rearrangement, signal transduction, and prostanoids formation and conversion. Although my scientific path taken several turns, it has always required the use of skills and knowledge of a cell biologist for sorting out some practical issues. I suppose, it is an exemplification of the thesis that, in science, it is important to adopt skills acquired at one step of professional career with the aim to find original answers to new challenges.

	PUBLICATIONS SUPPORTING HABILITATION APPLICATION			**OTHER PUBLICATIONS**			**ALL PUBLICATIONS**		
	n	*IF*	*Points*	*n*	*IF*	*Points*	*n*	*IF*	*Points*
Experimental	4	8,237	100	19	41,410	363	23	49,647	463
Review	1	3,704	30	5	9,412	42	6	13,124	72
Chapters in monographies	1	-	5		-	-	1	-	-
All	**6**	**11,941**	**135**	**24**	**50,822**	**405**	**30**	**62,763**	**565**
Before *Ph.D.*				4	3,034	20	4	3,034	20
After *Ph.D.*				20	47,788	185	26	59,729	545
Hirsh Index (WoS Core Collection)	**12**								
Citations	**541**								
- without self-citations	**522**								

TABLE 1 Summary of scientific achievement (citation acc. to *WoS Core Collection*, 21.11.2018).

Kraków, 23rd November, 2018

Małgorzata Pierzchalska

7. BIBLIOGRAPHY

Abreu M.T. (2010) Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.*, 10:131–44. doi: 10.1038/nri2707

Asghar W., El Assal R., Shafiee H. et al. (2015) Engineering cancer microenvironments for in vitro 3-D tumor models. *Mater. Today,* 18:539–553. doi: 10.1016/j.mattod.2015.05.002

Chin A.M., Hill D.R., Aurora M., Spence J.R. (2016) Morphogenesis and maturation of the embryonic and postnatal intestine. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 66:81–93. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.01.011

Ciorba M.A., Riehl T.E., Rao M.S. et al. (2012) *Lactobacillus* probiotic protects intestinal epithelium from radiation injury in a TLR-2/cyclo-oxygenase-2-dependent manner. *Gut,* 61:829–838. doi: 10.1136/gutjnl-2011-300367

Figtree G.A., Bubb K.J., Tang O. et al. (2017) Vascularized Cardiac Spheroids as Novel 3D in vitro Models to Study Cardiac Fibrosis. *Cells Tissues Organs*, 204:191–198. doi: 10.1159/000477436

Finkbeiner S.R., Spence J.R. (2013) A Gutsy Task: Generating Intestinal Tissue from Human Pluripotent Stem Cells. *Dig. Dis. Sci.*, 58:1176–84.

Finkbeiner S.R., Zeng X., Utama B. et al. (2012) Stem Cell-Derived Human Intestinal Organoids as an Infection Model for Rotaviruses. *MBio* 3:1–6. doi: 10.1128/mBio.00159-12.

Ganguli K., Meng D., Rautava S. et al. (2013) Probiotics prevent necrotizing enterocolitis by modulating enterocyte genes that regulate innate immune-mediated inflammation. *Am J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 304:G132--41. doi: 10.1152/ajpgi.00142.2012

Gawin M., Pierzchalska M., Grabacka M. (2016) Mouse intestinal organoids cultured in hanging drop. *N. Biotechnol.*, 33:S79. doi: https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.06.991

Goessling W., North TE., Loewer S. et al. (2009) Genetic interaction of PGE2 and Wnt signaling regulates developmental specification of stem cells and regeneration. *Cell,* 136:1136–1147. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.015.Genetic

Grainger S., Hryniuk A., Lohnes D. (2013) Cdx1 and Cdx2 exhibit transcriptional specificity in the intestine. *PLoS One* 8:1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0054757

Hillier L.W., Miller W., Birney E., et al. (2004) Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature,* 432:695–716. doi: 10.1038/nature03154

In J.G., Foulke-Abel J., Estes M.K. et al. (2016) Human mini-guts: new insights into intestinal physiology and host-pathogen interactions. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.*, 13:633–642.

Jabaji Z., Brinkley G.J., Khalil H.A. et al. (2014) Type I collagen as an extracellular matrix for the in vitro growth of human small intestinal epithelium. *PLoS One,* 9:1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0107814

Jayaraman S., Thangavel G., Kurian H., et al. (2013) *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poult. Sci.*, 92:370–374. doi: http://dx.doi.org/ 10.3382/ps.2012-02528

Kalabusheva E., Terskikh V., Vorotelyak E. (2018) Method of the year 2017: organoids. *Nat. Methods,* 15:1. doi: 10.1155/2017/9271869

Karve S.S., Pradhan S., Ward D.V., Weiss A.A. (2017) Intestinal organoids model human responses to infection by commensal and Shiga toxin producing Escherichia coli. *PLoS One,* 12:1–20. doi: 10.1371/journal.pone.0178966

Kuo C.T., Wang J.Y., Lin Y.F. et al. (2017) Three-dimensional spheroid culture targeting versatile tissue bioassays using a PDMS-based hanging drop array. *Sci. Rep.*, 7(1):4363. doi: 10.1038/s41598-017-04718-1

Lahar N., Lei N.Y., Wang J. et al. (2011) Intestinal subepithelial myofibroblasts support in vitro and in vivo growth of human small intestinal epithelium. *PLoS One,* 6:e26898. doi: 10.1371/journal.pone.0026898

Li J., Li J., Zhang S.Y., et al. (2018) Culture and characterization of chicken small intestinal crypts. *Poult. Sci.,* 97:1536–1543. doi: 10.3382/ps/pey010

Lin B., Miao Y., Wang J. et al. (2016) Surface tension guided hanging-drop: producing controllable 3D spheroid of high-passaged human dermal papilla cells and forming inductive microtissues for hair-follicle regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces,* 8:5906–5916. doi: 10.1021/acsami.6b00202

Lutful Kabir S.M. (2009) The role of probiotics in the poultry industry. *Int. J. Mol. Sci.,* 10:3531–3546. doi: 10.3390/ijms10083531

Markowiak P., Śliżewska K. (2017) Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients,* 9:1–30. doi: 10.3390/nu9091021

Markowiak P., Śliżewska K. (2018) The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition. *Gut Pathog.*, 10:1–20.

Mazzoleni G., Di Lorenzo D., Steimberg N. (2009) Modelling tissues in 3D: the next future of pharmaco-toxicology and food research? *Genes Nutr.*, 4:13–22. doi: 10.1007/s12263-008-0107-0

Miyoshi H., VanDussen K.L., Malvin N.P. et al. (2017) Prostaglandin E_2 promotes intestinal repair through an adaptive cellular response of the epithelium. *EMBO J.,* 36:5–24. doi: 10.15252/embj.201694660

Mottet A., Tempio G. (2017) Global poultry production: current state and future outlook and challenges. *Worlds Poult. Sci. J.*, 73:245–256. doi: 10.1017/S0043933917000071

Mustata R.C., Vasile G., Fernandez-Vallone V. et al. (2013) Identification of Lgr5-Independent Spheroid-Generating Progenitors of the Mouse Fetal Intestinal Epithelium. *Cell Rep.*, 5:421–432. doi: 10.1016/j.celrep.2013.09.005

Neal M.D., Sodhi C.P., Jia H. et al. (2012) Toll-like receptor 4 is expressed on intestinal stem cells and regulates their proliferation and apoptosis via the p53 up-regulated modulator of apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 287:37296–308. doi: 10.1074/jbc.M112.375881

Ootani A., Li X, Sangiorgi E., et al. (2009) Sustained in vitro intestinal epithelial culture within a Wnt-dependent stem cell niche. *Nat. Med., 15*:701–706. doi: 10.1038/nm.1951

Pott J., Hornef M. (2012) Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO Rep.,* 13:684–698. doi: 10.1038/embor.2012.96

Powell R.H., Behnke M.S. (2017) WRN conditioned media is sufficient for in vitro propagation of intestinal organoids from large farm and small companion animals. *Biol. Open,* 698–705. doi: 10.1242/bio.021717

Rakoff-Nahoum S., Medzhitov R. (2008) Role of Toll-Like receptors in tissue repair and tumorigenesis. *Biochem.,* 73:555–561. doi: 10.1134/S0006297908050088 Key

Roto S.M., Kwon Y.M., Ricke S.C. (2016) Applications of in ovo technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. *Front. Vet. Sci.*, 3:1–13. doi: 10.3389/fvets.2016.00063

Round J.L., Mazmanian S.K. (2009) The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat. Rev. Immunol.,* 9:313–23. doi: 10.1038/nri2515

Sachs N., Tsukamoto Y., Kujala P. et al. (2017) Intestinal epithelial organoids fuse to form self-organizing tubes in floating collagen gels. *Development*, 144:1107–1112. doi: 10.1242/dev.143933

Sato T., Clevers H. (2013) Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*, 340:1190–1194. doi: 10.1126/science.1234852

Sato T., Vries R.G., Snippert H.J. et al. (2009) Single Lgr5 stem cells build crypt-villus structures in vitro without a mesenchymal niche. *Nature*, 459:262–5. doi: 10.1038/nature07935

Sommer F., Bäckhed F. (2013) The gut microbiota - masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol.*, 11:227–238. doi: 10.1038/nrmicro2974

Stern C.D. (2005) The chick: A great model system becomes even greater. *Dev. Cell,* 8:9–17. doi: 10.1016/j.devcel.2004.11.018

Trevelline B.K., MacLeod K.J., Knutie S.A. et al. (2018) In ovo microbial communities: a potential mechanism for the initial acquisition of gut microbiota among oviparous birds and lizards. *Biol. Let.*, 14(7): 20180225. doi: 10.1098/rsbl.2018.0225.

Ueda T., Yamada T., Hokuto D. et al. (2010) Generation of functional gut-like organ from mouse induced pluripotent stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.,* 391:38–42. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.10.157

Viktorinová I., Henry I., Tomancak P. (2017) Epithelial rotation is preceded by planar symmetry breaking of actomyosin and protects epithelial tissue from cell deformations. *PLoS Genet.,* 13(11):e1007107. doi: 10.1371/journal.pgen.1007107.

Wells J.M., Spence J.R. (2014) How to make an intestine. *Development*, 141:752–60. doi: 10.1242/dev.097386

Yu L., Wang L., Chen S. (2010) Endogenous toll-like receptor ligands and their biological significance. *J. Cell Mol. Med.*, 14:2592–2603. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01127.x

Yui S., Nakamura T., Sato T. et al. (2012) Functional engraftment of colon epithelium expanded in vitro from a single adult $Lgr5^{+}$ stem cell. *Nat. Med.,* 18:618–23. doi: 10.1038/nm.2695

Zhang Y-G., Wu S., Xia Y., Sun J. (2014) Salmonella-infected crypt-derived intestinal organoid culture system for host-bacterial interactions. *Physiol. Rep.,* 2:e12147. doi: 10.14814/phy2.12147

Online source 1: Eurostat, 2017. (11.10.2018): https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php/Agricultural_production_-_animals#Poultry