



# Криоконсервация гермоплазмы самок сельскохозяйственных птиц как метод сохранения биоразнообразия.



**Станишевская Ольга Игоревна**

д.б.н., зав. лабораторией генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов с.-х. птиц ВНИИГРЖ

[olgastan@list.ru](mailto:olgastan@list.ru)

**Силукова Юлия Леонидовна, к.б.н, м.н.с.**

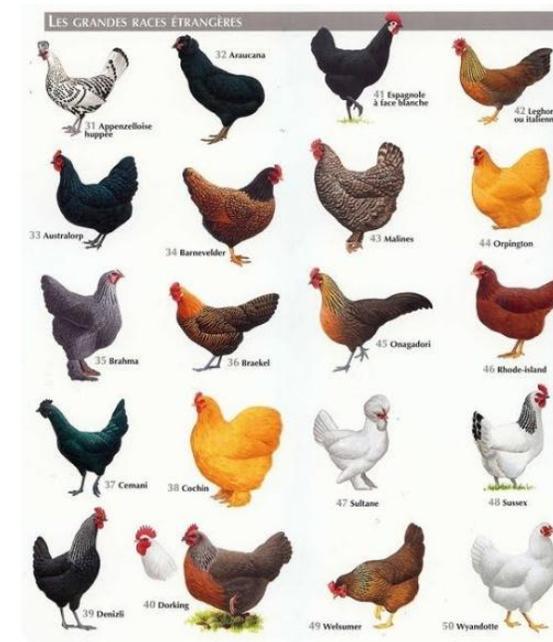


XXI Международная конференция Российского отделения ВНАП (НП «Научный центр по птицеводству»)  
«Мировое и российское птицеводство: динамика и перспективы развития — научные разработки по генетике и селекции сельскохозяйственной птицы, кормлению, инновационным технологиям производства и переработки яиц и мяса, ветеринарии, экономики отрасли»

ВНИТИП, 23—25 сентября 2024 г.

## Доля национальных пород с.-х. животных, сохраняемых в генетических банках, %

Регион	Доля национальных пород, сохраняемых в генетических банках, %		
	Статус	КРС	Птица
Африка	законсервировано	12	2
	достаточно материала	8	2
Азия	законсервировано	32	19
	достаточно материала	15	10
Европа и Кавказ	законсервировано	40	5
	достаточно материала	23	3
Латинская Америка и Карибы	законсервировано	15	0
	достаточно материала	12	0
Северная Америка	законсервировано	74	25
	достаточно материала	33	3
Ближний и Средний Восток	законсервировано	4	0
	достаточно материала	4	0
Мир	законсервировано	27	6
	достаточно материала	16	3



<https://www.pinterest.jp/pin/83879611802468915/>

**1641 порода кур**  
**19% под угрозой уничтожения или вымерли**  
**64% статус неизвестен**

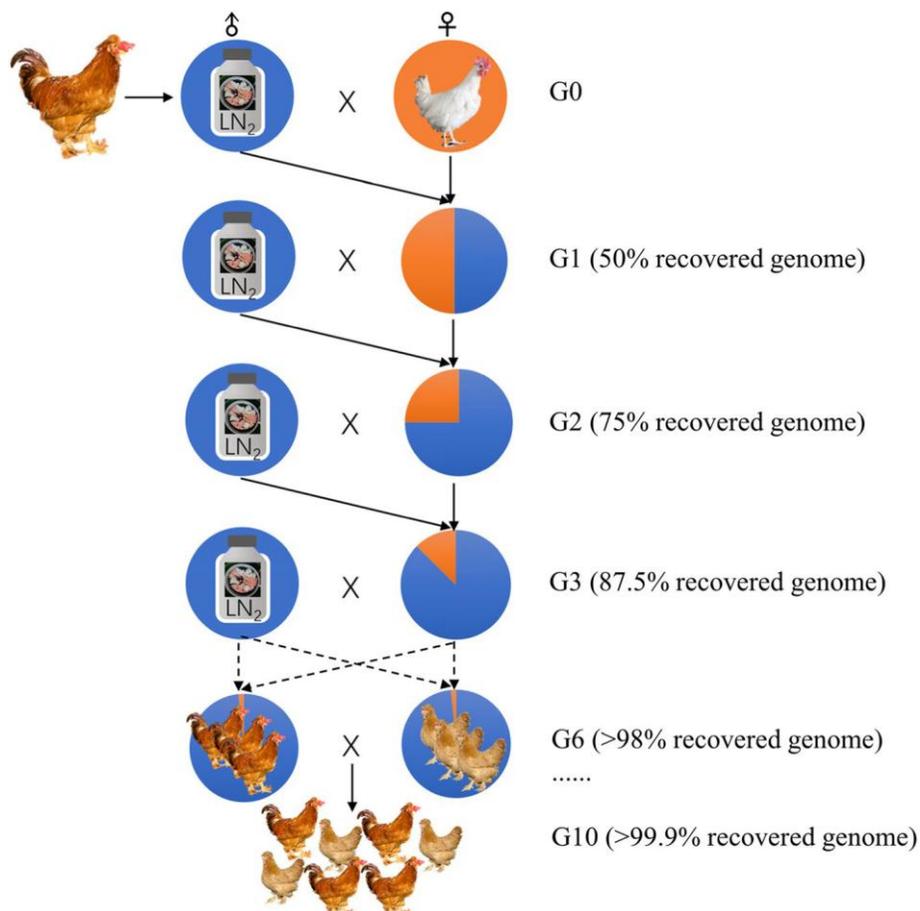
<https://alitoools.io/ru/showcase/modelirovanie-milih-domashnih-zhivotnih-korova-telenok-angus-bik-buyvol-modely-figurki-razvivayushtie-pvh-milaya-igrushka-detskiy-podarok-4000867545298>

Источник: FAO, Country reports, 2014

## Методы сохранения гермоплазмы птиц (половых клеток и их предшественников) *in vitro*

- **Криоконсервация семени** самцов сельскохозяйственных птиц
- **Криоконсервация женских гамет** за счет витрификации тканей донорских яичников самок недельного возраста с последующей трансплантацией реципиентам или витрификации эмбриональных гонад с последующим выделением клеток-предшественников гамет и их ретрансплантацией эмбрионам-реципиентам
- **Криоконсервация плюрипотентных зародышевых клеток**
  - **бластодермальных клеток (BCs)** эмбрионов на стадии Х, которые включают некоторое количество зародышевых клеток
  - **первичных зародышевых клеток (PGCs)** из зародышевой серповидной области или эмбриональной кровеносной системы
- **Криоконсервация соматических клеток эмбрионов (CEFs)** с последующим перепрограммированием для получения индуцированных первичных зародышевых клеток (iPGCs)

## Восстановление исчезнувшей породы кур за счет использования заморожено-оттаянного семени из криобанка



Необходимый запас семени для воспроизводства породы 125 гол (FAO-2015) **17 соломин** на 1 голову  
**2125 соломин**  
Доза осеменения 0,2 мл  
**Общий объем з/о семени ~ 1000 мл\***  
Средний объем эякулята петуха 0,5 мл  
\*<https://doi.org/10.1093/ps/86.3.555> по данным французского криобанка

Существующие на сегодняшний день «работающие» методы сохранения только репродуктивных клеток самцов птиц (спермиев) позволяют восстанавливать исчезающие породы/популяции лишь за счет возвратного скрещивания. Происходит частичная потеря материнского наследственного материала, поскольку гетерогаметным полом являются женский. Не сохраняется митохондриальный геном яйцеклетки. Рекомендуется контроль за результатами скрещивания с использованием молекулярно-генетических методов.

**Схема реконструкции породы при использовании заморожено-оттаянного семени**

Sun et al. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2022) 13:115  
<https://doi.org/10.1186/s40104-022-00768-2>

**Необходимо развитие методов криоконсервации женских гамет.**

## Криоконсервация гермоплазмы самок птиц



Рис. 1. Крупные фолликулы в яичнике высокопродуктивных кур

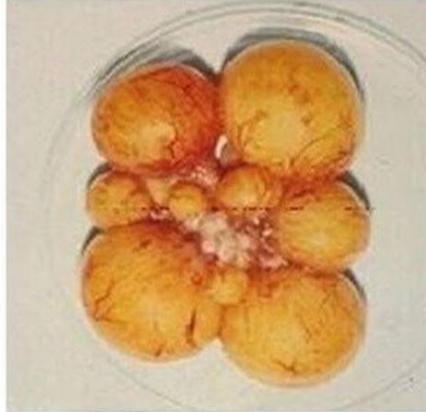
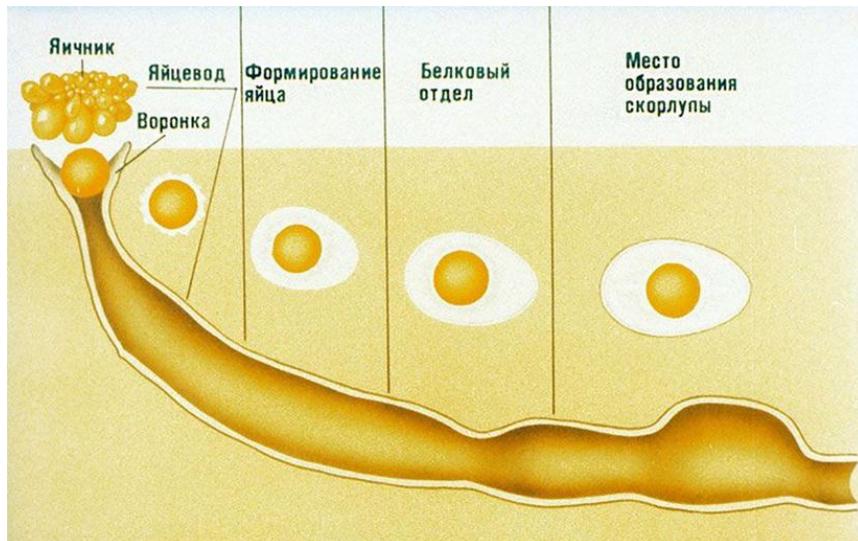
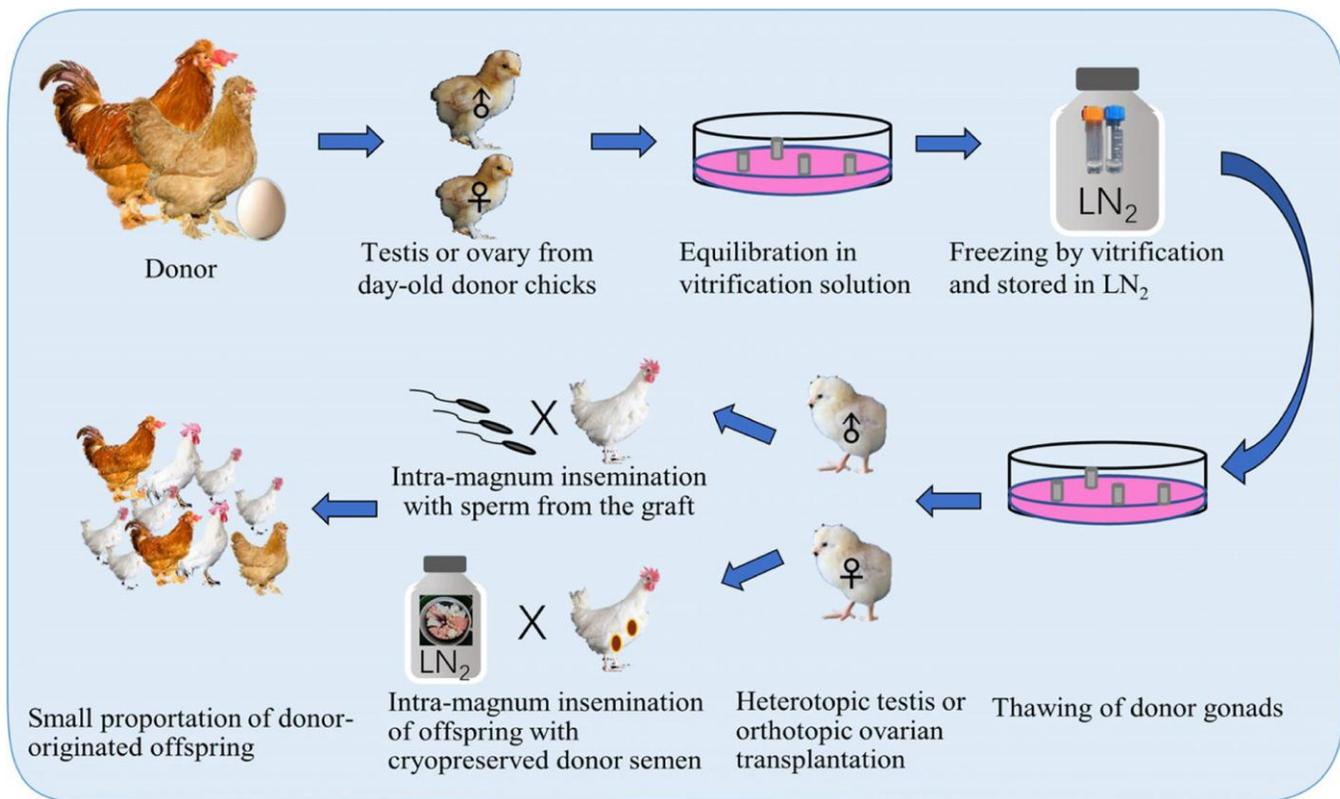


Рис. 2. Повышенное количество фолликул у мясо-яичных кур



**Криоконсервация зрелой яйцеклетки и эмбриона** макролецитальных видов животных (включая птиц) нецелесообразна из-за больших размеров (размер ооцита птиц от 1 до 10 см в диаметре в зависимости от вида птиц) и высокого содержания липидов в яйцеклетке (объем желтка составляет более 95 процентов содержимого яйцеклетки), а также ввиду особенностей строения репродуктивного аппарата.

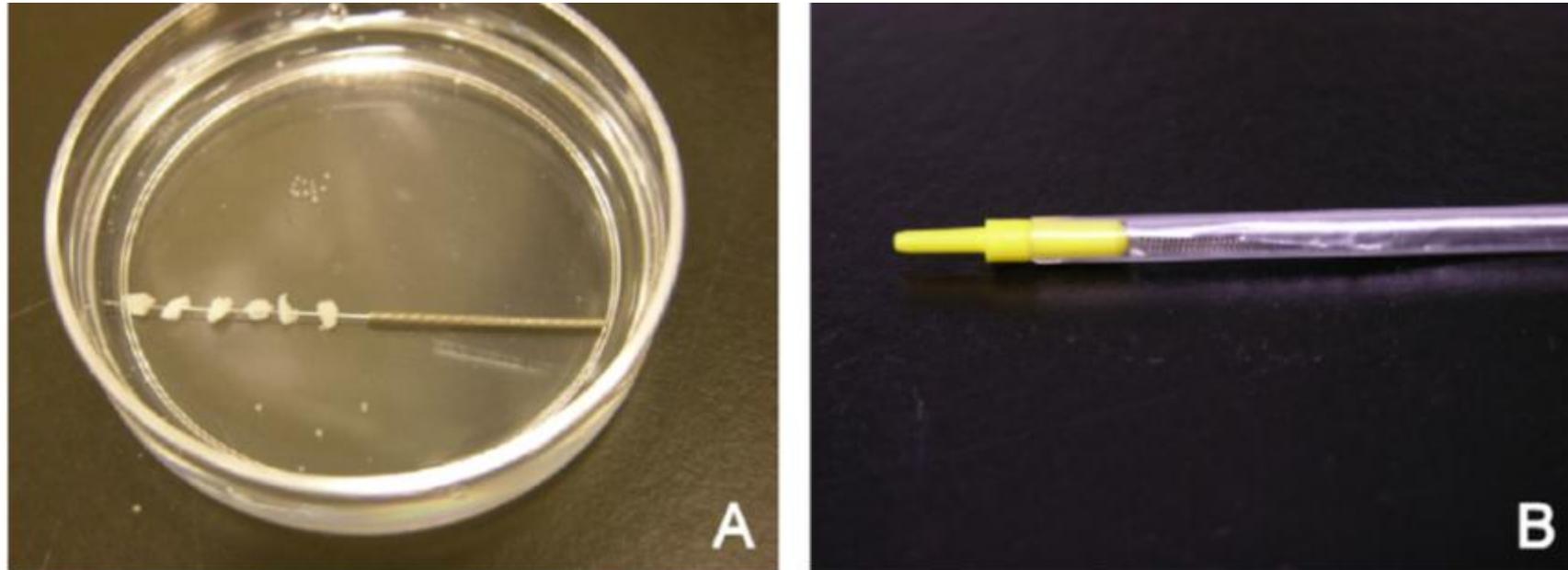
## Метод криоконсервации и трансплантации (аллотрансплантация, ксенотрансплантация) постнатальной ткани гонад



Одним путей решения проблемы долговременного сохранения репродуктивного материала самок сельскохозяйственных птиц является криоконсервация тканей гонад на стадии, когда ооциты еще не содержат желток, и их последующая трансплантация реципиентам ( Liu et al., 2010, Liptóí et al., 2021 ).

В национальных генетических банках Канады и США хранятся запасы криоконсервированных яичников и семенников нескольких видов домашней птицы (курицы, японского перепела и чилийского тинаму).

## Замораживание тканей яичников птиц



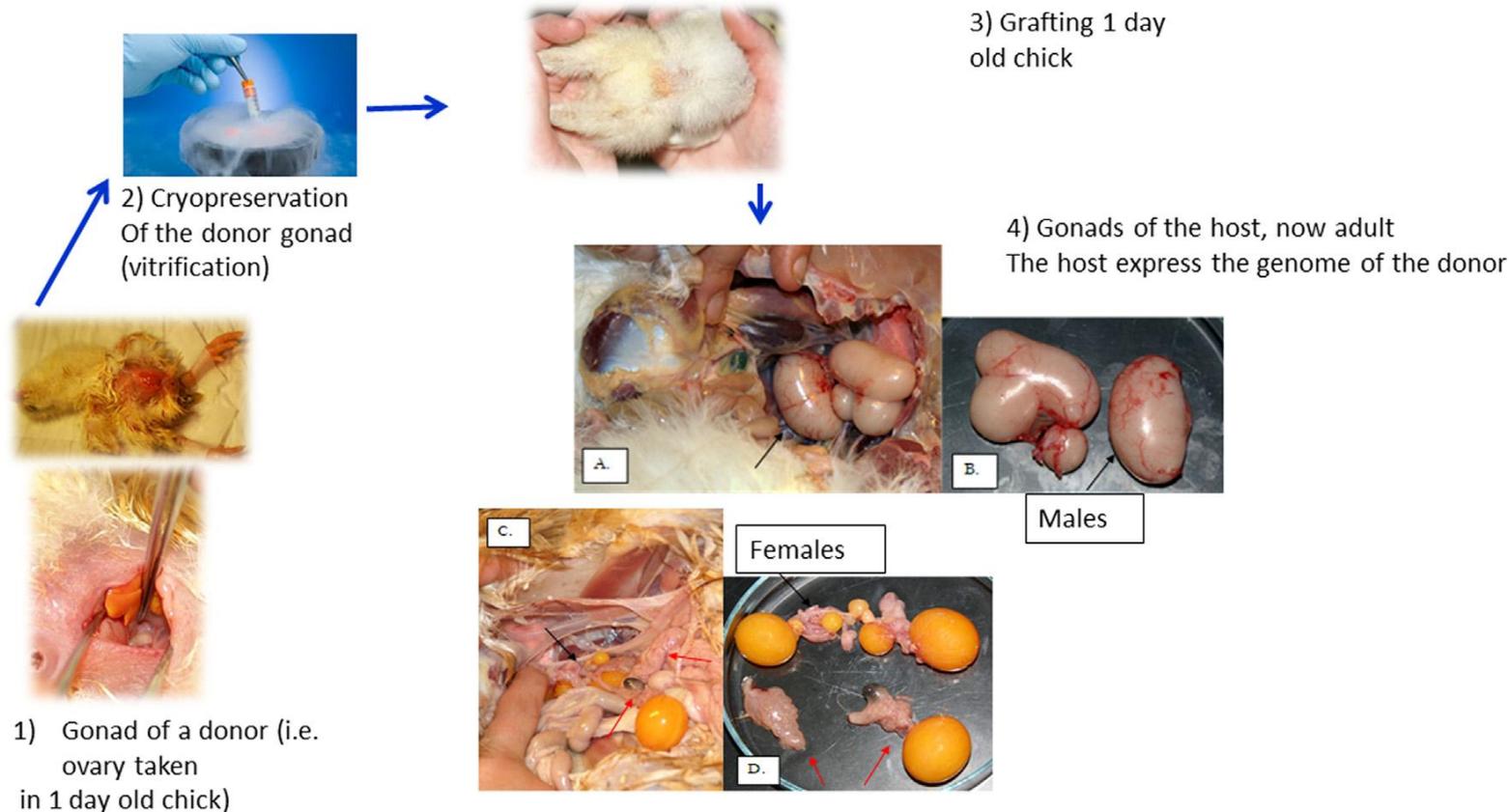
**Fig.1.** Needle-in-straw (NIS) vitrification device. (A) Ovarian fragments carried by a needle; (B) a demonstration of the device: tin foil including tissue fragments on a needle was inserted into a straw, with the end of the straw sealed by an adaptor plug.

Jianan Liua, Kimberly M. Chenga, Frederick G. Silversides

Novel needle-in-straw vitrification can effectively preserve the follicle morphology, viability, and vascularization of ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*) *Animal Reproduction Science* 134(3-4):197-202

DOI: [10.1016/j.anireprosci.2012.08.002](https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2012.08.002)

Однако, степень разработанности этой технологии далека от её практического применения для получения живого потомства (9%) и находится на стадии отдельных экспериментов. Необходимо совершенствование хирургических методов и подбор совместимых доноров и реципиентов.

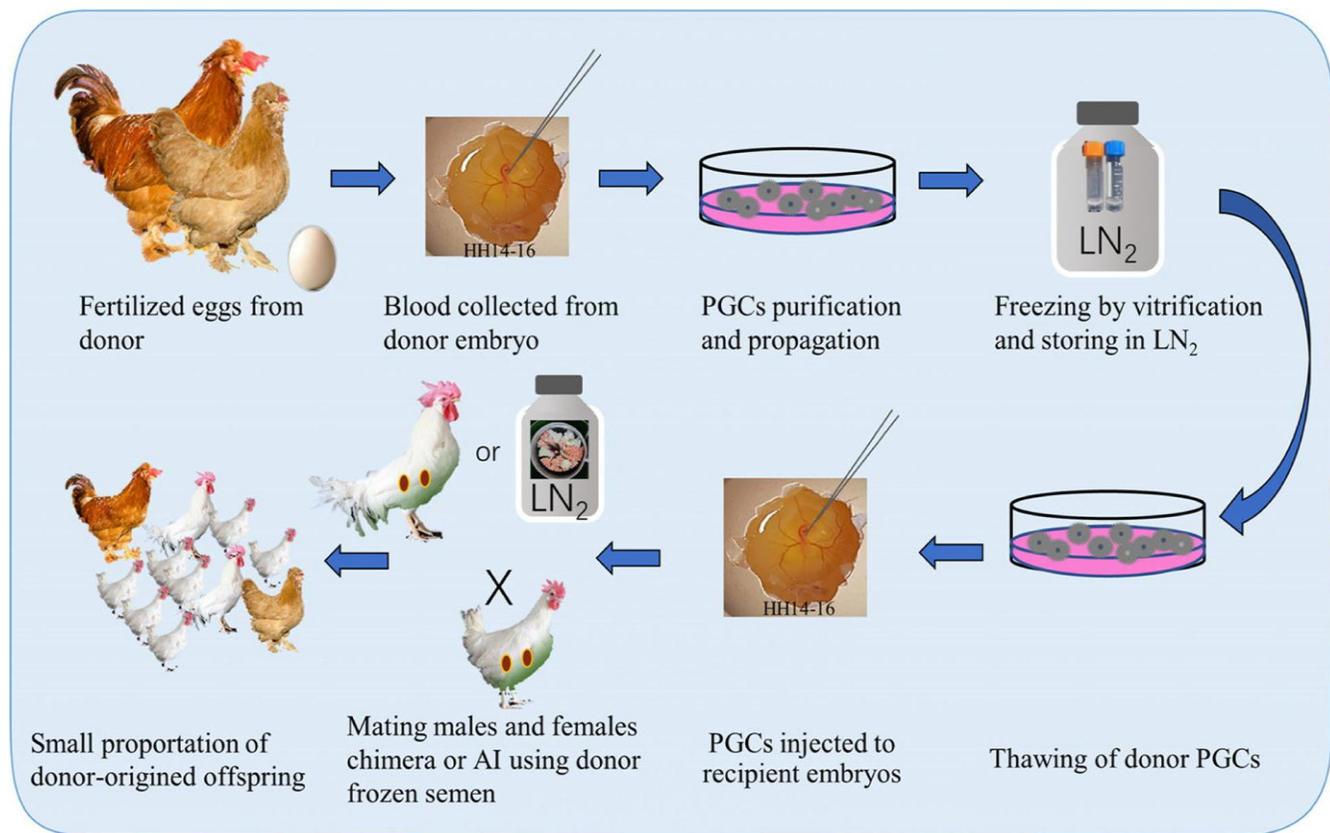


### Криоконсервация и трансплантация гонад:

- (1) Удаление гонады суточного цыпленка-донора.
- (2) Витрификация гонады.
- (3) Криоконсервированную гонаду оттаивают и пересаживают реципиенту - молодому цыпленку, у которого большая часть собственной ткани гонады удалена.
- (4) Яичники (если гонада самки) взрослой особи-реципиента могут экспрессировать геном донора.

*Photos from K. Liptoi, NCBGC, Hungary*

## Криоконсервация первичных зародышевых клеток (PGCs) с последующей реимплантацией эмбрионам-реципиентам.



Проблема отчасти может быть решена за счет криоконсервации и последующей трансплантации куриных первичных зародышевых клеток (PGCs), извлеченных из серповидной области эмбриона или из его сосудистой системы (стадия 13-17 HH).

PGCs птиц имеют более высокую криоустойчивость по сравнению со сперматозоидами.

Реимплантация PGCs эмбрионам-реципиентам на соответствующих стадиях развития позволяет получать химерное потомство донорской зародышевой линии и, в результате дальнейших спариваний, восстанавливать донорскую породу.

# Пример использования PGCs для реконструкции породы кур Black Castellana

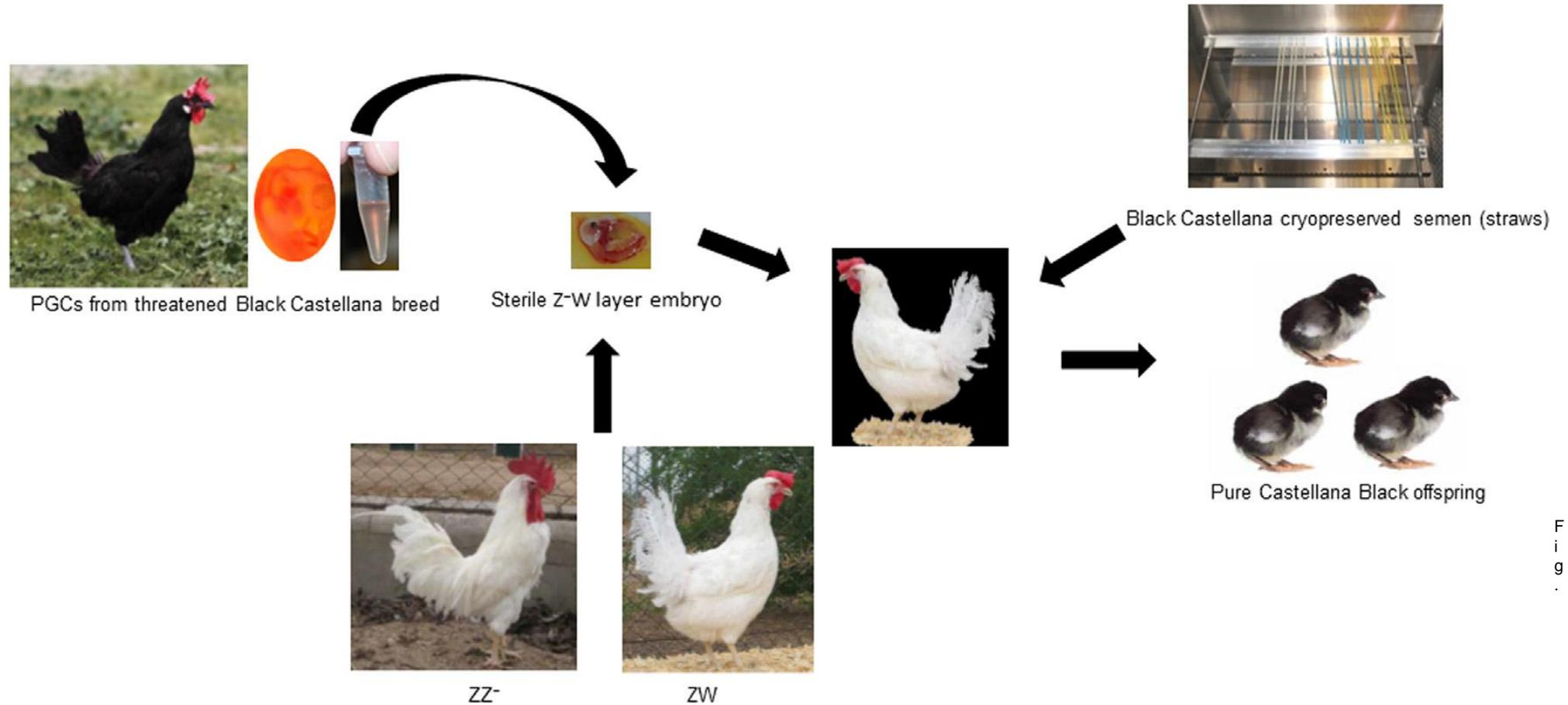
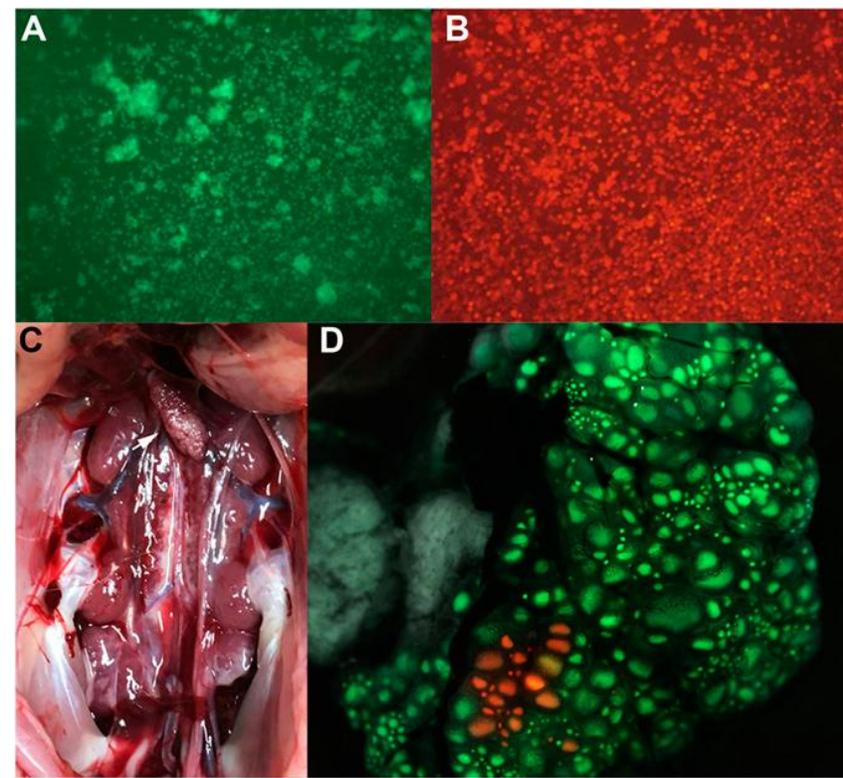


Fig.

J. Santiago-Moreno , E. Blesbois Animal board invited review: Germplasm technologies for use with poultry Animal

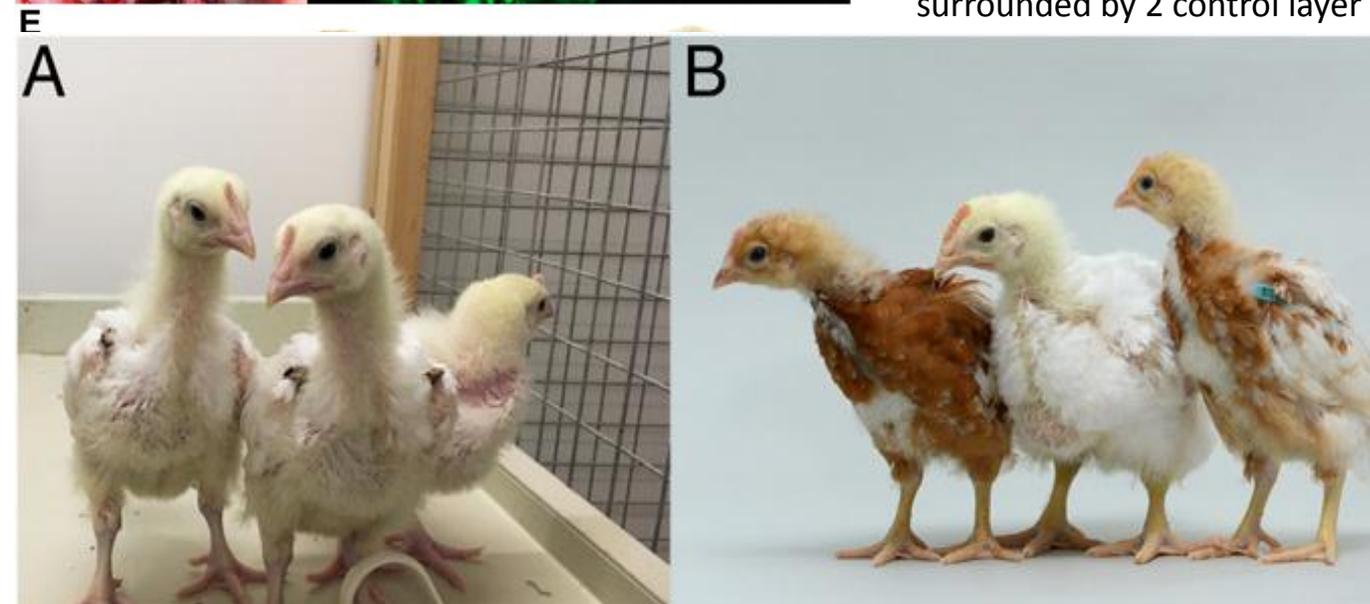
Volume 16, Issue 3, March 2022, 100475

<https://doi.org/10.1016/j.animal.2022.100475>



Germline transmission using layer sterile surrogate hosts. (A and B) Vantress heritage broiler PGCs labeled with GFP or TdTomato fluorescent reporter transposons. (C and D) Ovary from a DDX4 Z- W hen at 8 wk posthatch injected with labeled PGCs.

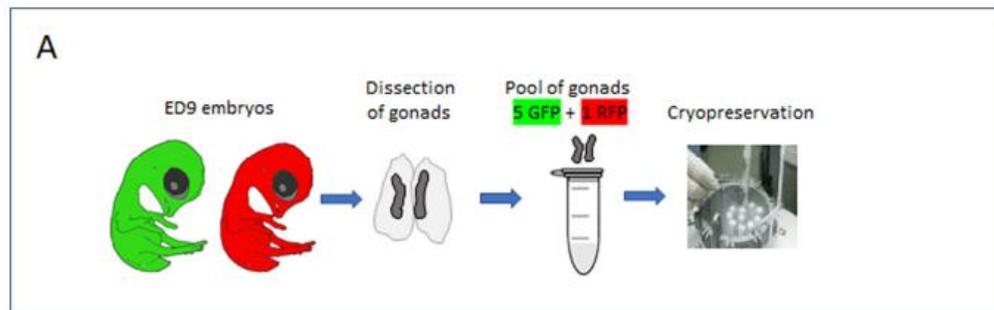
Pure offspring produced from DDX4 Z- W hens using heritage broiler semen. (A) Fresh or (B) cryopreserved semen pooled from 3 adult males was used to fertilize a DDX4 Z- W founder female. The pure line Vantress chick in B is shown surrounded by 2 control layer offspring.



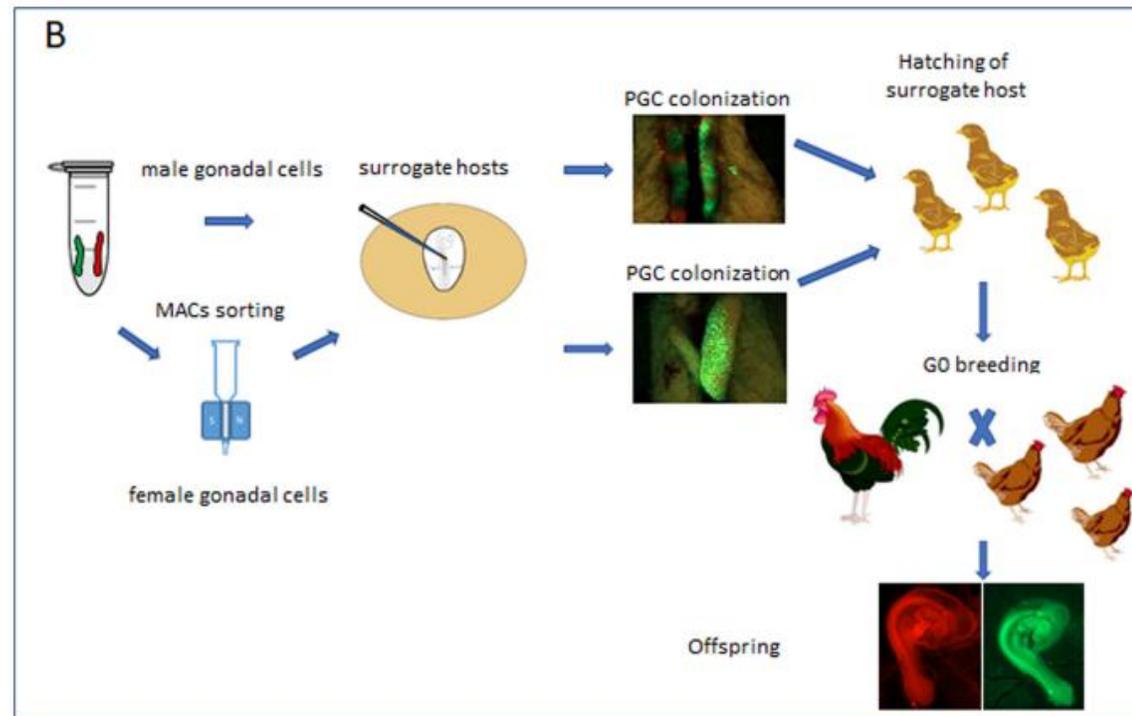
**Однако, не смотря на полученные за последние десятилетия достижения в области исследования PGCs птиц, имеется ряд технологических препятствий для их широкого использования в качестве генетического материала криобанков.**

**Необходимо проведение дальнейших исследований с целью повышения качества клеток после их культивирования, жизнеспособности эмбрионов-реципиентов после трансплантации донорских PGCs, полного устранения эндогенных зародышевых клеток реципиента, увеличения процента химер и числа гамет, полученных от них.**

# МЕТОД ИНТРАОВАРИАЛЬНОЙ КРИОКОНСЕРВАЦИИ ЖЕНСКИХ ГАМЕТ С.-Х. ПТИЦ



Isolation and cryopreservation of embryonic gonads followed by transmission through sterile surrogate hosts. (A) Embryonic day (ED) 9 gonads are isolated from embryos, pooled by sex, and cryopreserved in liquid N<sub>2</sub>. (B) The frozen gonads are thawed, dissociated, and injected into sterile surrogate host embryos. The surrogate host embryos are incubated and hatched and bred to hatch donor gonadal offspring



Известно, что исходная популяция PGCs быстро увеличивается после колонизации зачатка гонад и насчитывает многие десятки тысяч митотически делящихся клеток.

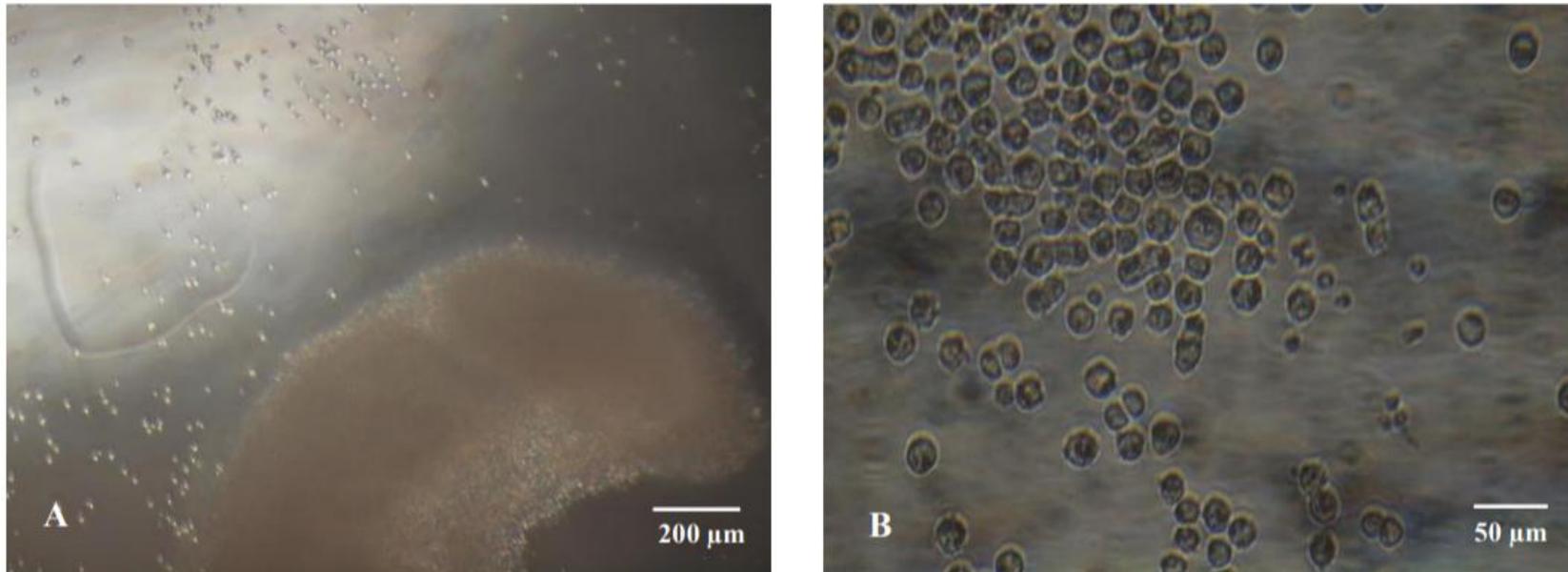
За этой пролиферативной фазой следует мейотическое вступление женских гонадных зародышевых клеток на 15-й эмбриональный день.

Зародышевые клетки женских гонад, повторно введенные в эмбрионы на миграционной стадии, будут повторно мигрировать и колонизировать гонаду хозяина (Tajima et al., 1998; Naito et al., 2007).

Фактически, исследователи продемонстрировали, что половые клетки гонад колонизируют гонаду хозяина и образуют как функциональные гаметы, так и потомство (Tajima et al., 1998; Mozdziak et al., 2006).

Таким образом, гонадные первичные половые клетки должны быть достаточными для биобанкинга и восстановления породы кур в сочетании со стерильной птицей-хозяином.

## Первичные половые клетки (GGSc), выделенные из эмбриональных яичников птиц



Gonadal PGCs cells from embryonic gonad of KUB chicken after 1 hour incubation in PBS [-] at 38°C. A) PGCs released from gonad, B) harvested isolated PGCs.

S. Sopiyanaa, M. A. Setiadib, M. Fahrudinc , I. Supriatnab. Isolation and Number of Gonadal Primordial Germ Cells (Gonadal PGCs) on the Stages of Early Embryonic Development of KUB Chicken. Media Peternakan, April 2017, 40(1):1-6 DOI: <https://doi.org/10.5398/medpet.2017.40.1.1>

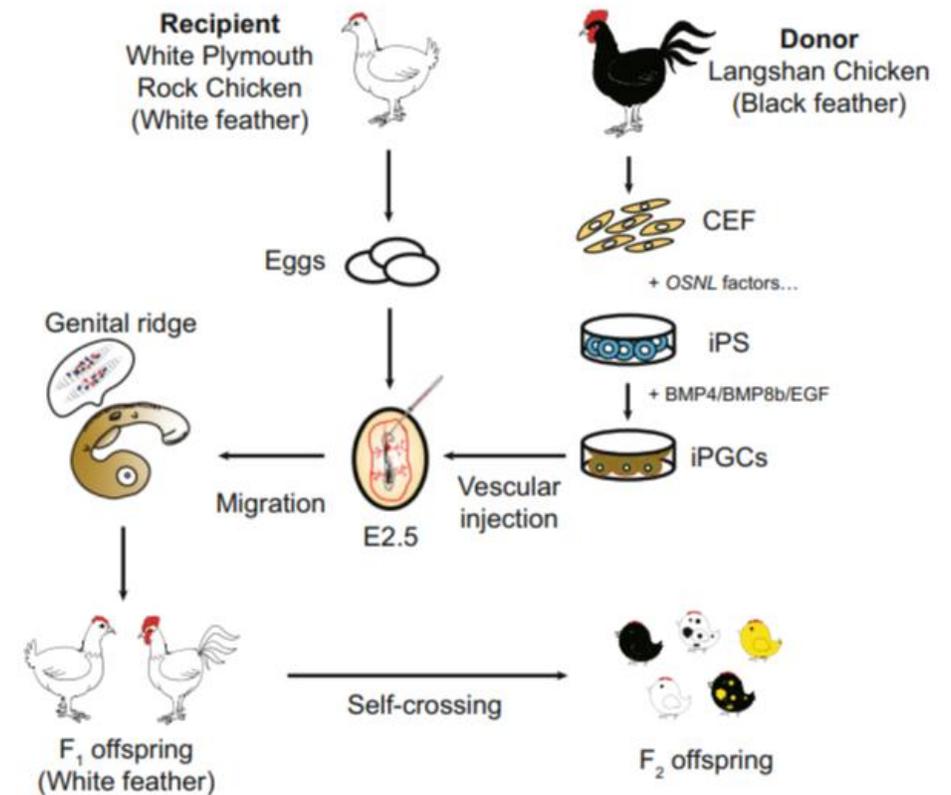
## Криоконсервация соматических клеток эмбрионов (CEFs) с последующим перепрограммированием для получения индуцированных первичных зародышевых клеток (iPGCs)

Разработан способ получения индуцированных PGCs (iPGCs) из соматических клеток курицы и получено живое потомство донорского происхождения.

Фибробласты куриного эмбриона (CEFs) перепрограммированы в iPGCs путем экспрессии генов *Oct4/Sox2/Nanog/Lin28A (OSNL)*, которые далее индуцируются для дифференциации в PGCs с помощью BMP4/BMP8b/EGF. Деметилирование ДНК, ацетилирование гистонов и гликолитическая активация повышают эффективность индукции iPSCs, тогда как ацетилирование гистонов и гликолитическое ингибирование способствуют образованию PGCs.

После трансплантации донорских iPGCs, эти клетки способны мигрировать и возвращаться в генитальные гребни эмбриона, производя жизнеспособное потомство.

Соматические клетки легко доступны в больших количествах ( $10^7$  на эмбрион) и могут быстро пролиферировать *in vitro*, хотя сложность и затраты при использовании соматических клеток намного выше. В долгосрочной перспективе – эффективный метод сохранения и восстановления генетических ресурсов.



**Fig. 8 Schematic diagram of the viable offspring production derived from donor CEF.** CEFs of black feathered Langshan chickens were induced to differentiate into iPGCs and injected into the embryos of White Plymouth Rock chickens. The injected iPGCs migrate to the genital ridge and develop into germ cells. The recipients with transplanted iPGCs produced viable offspring showing characteristics of black feathered Langshan chickens by self-crossing.

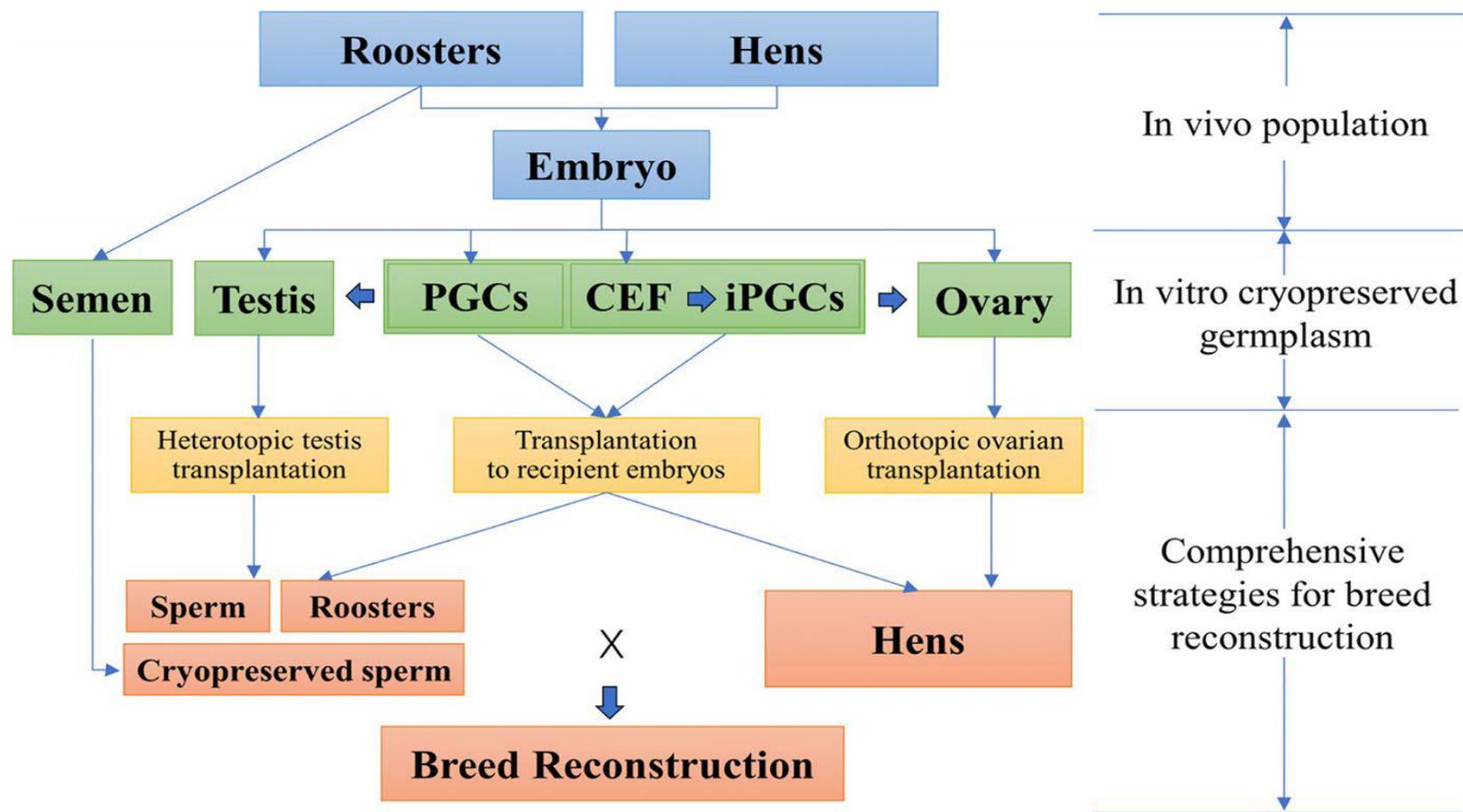
## Процесс замораживания-оттаивания гамет может вызывать клеточные и молекулярные модификации, оказывающие пагубное воздействие на генетическую стабильность.

### Установлено в экспериментах с мужскими гаметами:

- Процесс криоконсервации не только изменяет структуру и функцию сперматозоидов, но и провоцирует **фрагментацию хроматина и повреждения ДНК**. В исследовании на человеке показано, что криоконсервация вызывает **изменения транскриптома сперматозоидов** - установлено более низкое содержание транскриптов в замороженной и витрифицированной сперме, чем в свежих образцах (*Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25(7), 4131; <https://doi.org/10.3390/ijms25074131>.)
- Установлено, что **клеточные и эпигенетические модификации** являются основными причинами, лежащими в основе снижения подвижности и фертильности сперматозоидов петухов в процессе замораживания-оттаивания. Экспериментально доказано, что **состав криопротекторной среды** может не оказывать влияния на процесс метилирования ДНК сперматозоида, но при этом приводит к значительному изменению степени **ацетилирования гистона H3K9** и **метилирования H3K4** у кур по сравнению со свежей спермой (Masoumeh Salehi et al, 2020; Beck D. et al, 2021)
- В литературе имеются данные о том, что после размораживания сперматозоиды с фрагментированной ДНК могут **иметь увеличенную длину теломер и измененную экспрессию генов у эмбрионов рыб**. (Sun et al. *Journal of Animal Science and Biotechnology* (2022) 13:115 <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00768-2>)
- Отцовские регуляторные факторы играют важную роль в формировании пронуклеусов, временном порядке деления бластомеров, активации зиготического генома, развитии эмбрионов и даже фенотипе потомства. **Стресс изменяет профиль microRNA и вызывает нарушения в развитии эмбрионов**. Ранние эмбрионы, полученные при использовании оттаянного семени, демонстрируют транскриптомные изменения, которые могут поставить под угрозу их развитие (doi: 10.1101/gr.252981.119)
- Установлено, что около 10% эмбриональной РНК имеет отцовское происхождение, которая, в свою очередь, подвержена **эпигенетическому воздействию в процессе криоконсервации семени** (doi: 10/15252/embj.201488117)

**Но проблемы могут быть актуальными и для женских гамет!**

# Объединенная схема современных методов сохранения и восстановления пород сельскохозяйственных птиц



## Сравнительная стоимость программ сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц

**Table 5.** *Straws stored, time for recovery, and costs (\$US) of preservation, storage, and recovery of avian lines with  $N_e = 50$*

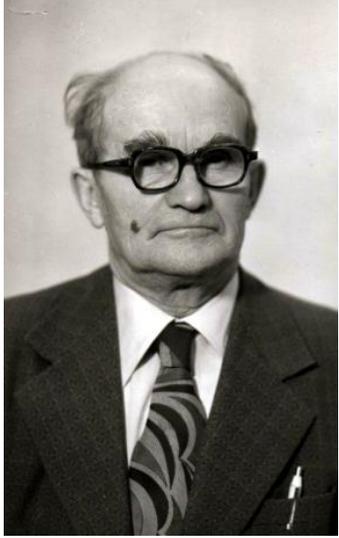
Method of conservation	Straws conserved per line	Time for recovery	Cost of preservation		Annual cost		Cost of recovery	
			1 line	20 lines	1 line	20 lines	1 line	20 lines
Live	0	0	0	0	\$104 479	\$236 010	0	0
Semen	188	3 years	\$2370	\$21 947	\$1614	\$2364	\$263 578	\$1 144 280
Ovaries and semen	113	43 weeks	\$2295	\$29 540	\$1614	\$1864	\$91 720	\$301 655

F.G. Silversides , P.H. Purdy & H.D. Blackburn (2012) Comparative costs of programmes to conserve chicken genetic variation based on maintaining living populations or storing cryopreserved material, *British Poultry Science*, 53:5, 599-607, DOI: 10.1080/00071668.2012.727383



**Задачи по разработке методов сохранения *in vitro* женских гамет сельскохозяйственных птиц имеют хорошие перспективы и могут быть успешно решены в ближайшем будущем, что, несомненно, будет способствовать полноценному сохранению биоразнообразия сельскохозяйственных птиц и их диких сородичей.**

## Исследования ВНИИГРЖ в области сохранения генетических ресурсов с.-х. птиц методами *in vitro*.



Под руководством доктора с.-х. наук, профессора **А. Д. Курбатова** в 70-е годы XX века начаты исследования по разработке принципиально новых способов криоконсервации спермы самцов птиц, позволяющих сохранять генофонд исчезающих пород и видов, использовать заморожено-оттаянную сперму самцов с высокой племенной ценностью и при этом сохранять её высокую оплодотворяющую способность.

**В НАСТОЯЩЕЕ ВРЕМЯ** сотрудники отдела генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов с.-х. птиц ВНИИГРЖ продолжают исследования по криоконсервации семени птиц в следующих направлениях:

- разработка методов оценки и отбора самцов по криоустойчивости их семени с целью создания криобанка; исследования по генетической обусловленности криоустойчивости семени;
- создание новых составов сред для криоконсервации семени самцов с.-х. птиц, обеспечивающих высокий уровень сохранности мембран сперматозоидов и их органоидов, хроматина, кинетического аппарата и, как следствие, фертильности;
- совершенствование методов оценки функциональной полноценности сперматозоидов *in vitro*;
- создание каталогизированного криобанка семени с.-х. птиц 40 пород и популяций;
- разработка методов интраовариальной криоконсервации клеток-предшественников женских гамет для сохранению генофонда с.-х. птиц.





Благодарю  
за внимание!