

ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И РАЗВЕДЕНИЯ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ – ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО
БЮДЖЕТНОГО НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
ЖИВОТНОВОДСТВА – ВИЖ ИМЕНИ АКАДЕМИКА Л.К. ЭРНСТА»

**XXIV-Я НАУЧНАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ МОЛОДЫХ УЧЕНЫХ
«БИОТЕХНОЛОГИЯ В РАСТЕНИЕВОДСТВЕ, ЖИВОТНОВОДСТВЕ И
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ МИКРОБИОЛОГИИ»**

**БИОТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ, КУЛЬТИВИРОВАНИЯ И КРИОКОНСЕРВАЦИИ
ПРИМОРДИАЛЬНЫХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК КУР**

Пегливанян Григорий Карапетович
м. н. с. лаб. молекулярной генетики
ВНИИГРЖ

Москва

2024 г.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда
№ 24-16-00133, <https://rscf.ru/project/24-16-00133/>

Актуальность

Изучение функциональных особенностей примордиальных половых клеток (PGC) птиц, а также разработка биотехнологических методов и подходов работы с примордиальными половыми клетками кур не вызывает сомнения. Комплекс таких биотехнологических методов может быть использован для создания и усовершенствования отечественных высокопродуктивных пород кур с целью решения задач продовольственной безопасности страны, а также создания биоресурсных коллекций для сохранения уникальных генотипов и ценного генетического материала генофондных и аборигенных пород кур и редких исчезающих видов птиц.

Цели и задачи

Цель: разработка биотехнологического процесса и изучение функциональных особенностей PGC кур пушкинской и русской белой пород в процессе их получения, культивирования и криоконсервации.

Задачи:

1. Определить массу яйца и возраст эмбрионов для получения образцов крови и культивирования PGC;
2. Разработать технологически подход для взятия образцов крови у четырехдневных эмбрионов для получения PGC;
3. Подобрать состав среды для культивирования PGC;
4. Провести анализ экспрессии генов специфичных для примордиальных половых клеток кур и оценить возможность их использования для идентификации;
5. Определить влияние бусульфана на концентрацию получаемых из эмбрионов PGC, а также на экспрессию специфичных для PGC генов с целью возможного дальнейшего исключения конкуренции между PGC реципиента и донора;
6. Подобрать параметры декриоконсервации PGC кур.

Материалы и методы

Объект исследований: примордиальные половые клетки кур полученные из эмбрионов пушкинской и русской белой пород.

Методы:

1. Цитологические:

- культивирование (CO₂-инкубатор, 37°C, 4% CO₂, влажность 85%);
- дифференциация живых и мертвых клеток (окрашивание трипановым синим);
- подсчет клеток (камера Горяева);
- гистохимическое окрашивание примордиальных половых клеток кур (ШИК - реакция);

2. Молекулярно-генетические:

- анализ экспрессии генов (ПЦР – real-time), QuantStudio 5 (Thermo Fisher Scientific Inc., США),
- реагентом ExtractRNA (Евроген, Россия); QuantStudio Design Analysis Software v. 1.3;

3. Биотехнологические:

- инкубация яиц (лабораторный инкубатор ИФХ-250НС, 37,5–38,0°C, влажность 65–70%);
- получение PGCs с помощью микроманипуляции;

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Классический метод отбора проб (перенос на чашку Петри)



Рис. 1 Вскрытый эмбрион под бинокуляром в чашке Петри.

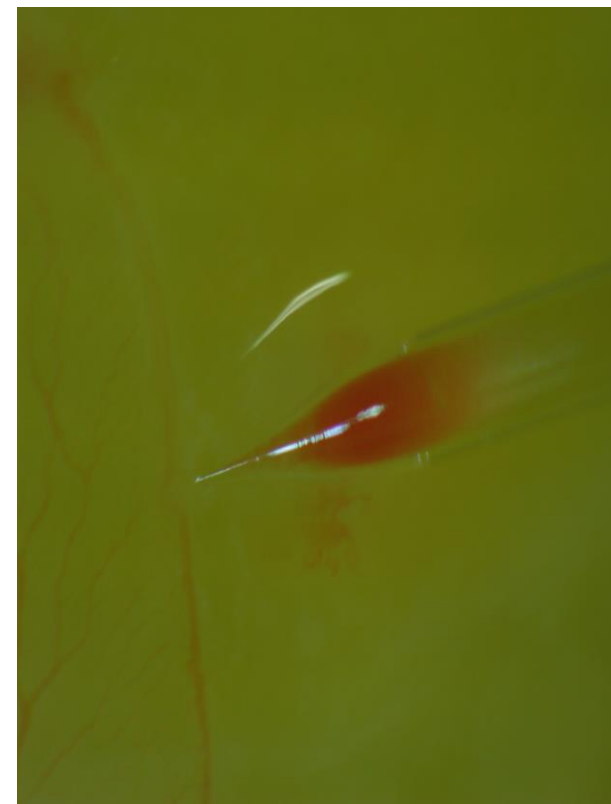
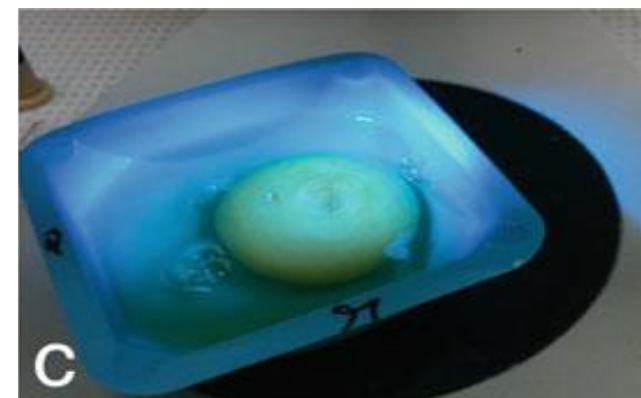
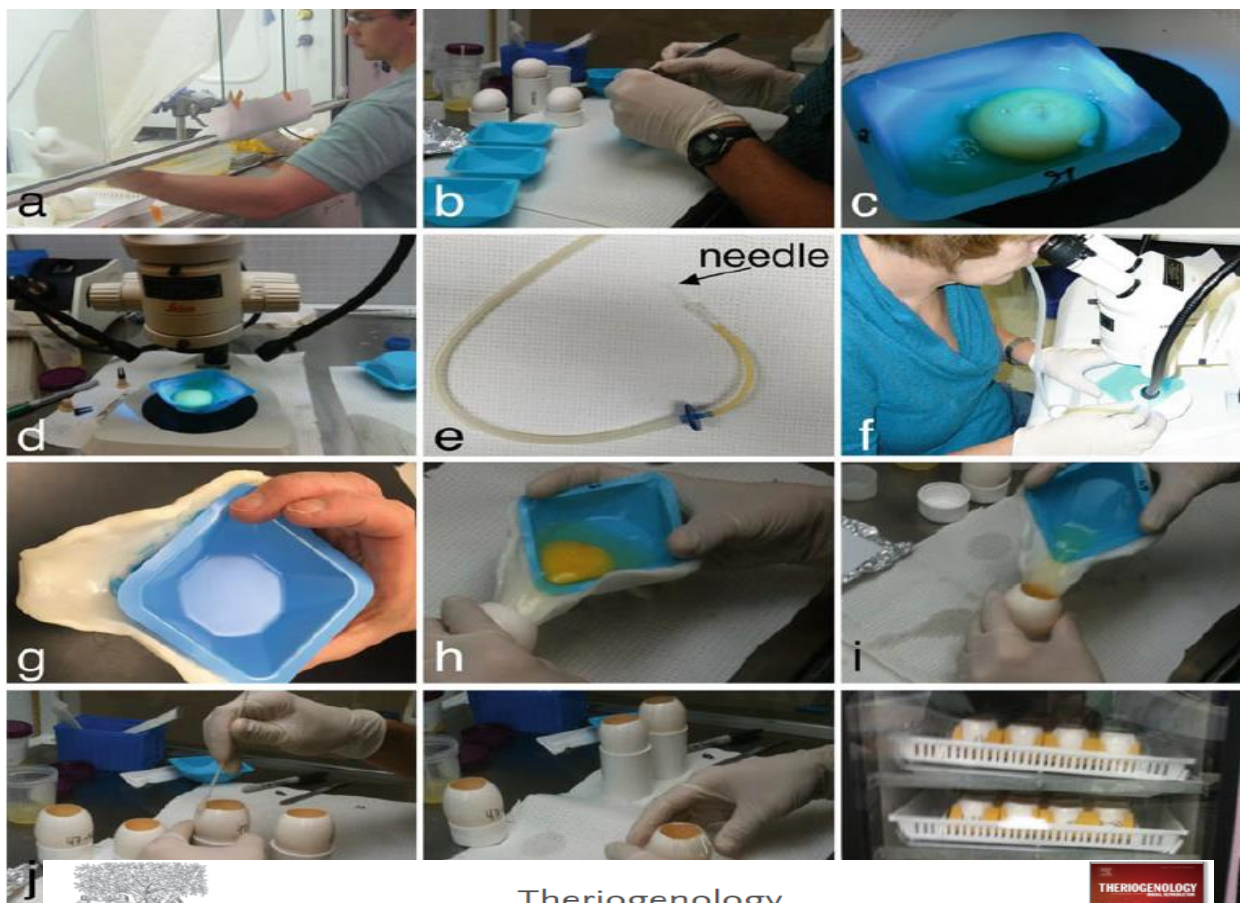


Рис. 2 Отбор пробы крови с дорсальной вены

Технология получения PGC (общепринятый метод)



Theriogenology
Volume 58, Issue 8, November 2002, Pages 1531-1539



Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained in vitro for an extended period

Jae Yong Han ^a, Tae Sub Park ^{a, c}, Yeong Ho Hong ^b, Dong Kee Jeong ^a, Jin Nam Kim ^a, Ki Dong Kim ^a, Jeong Mook Lim ^a

Отбор проб крови с помощью микроманипулятора методом «in ovo»



Рис. 3 Вскрытый
эмбрион кур русской
белой породы

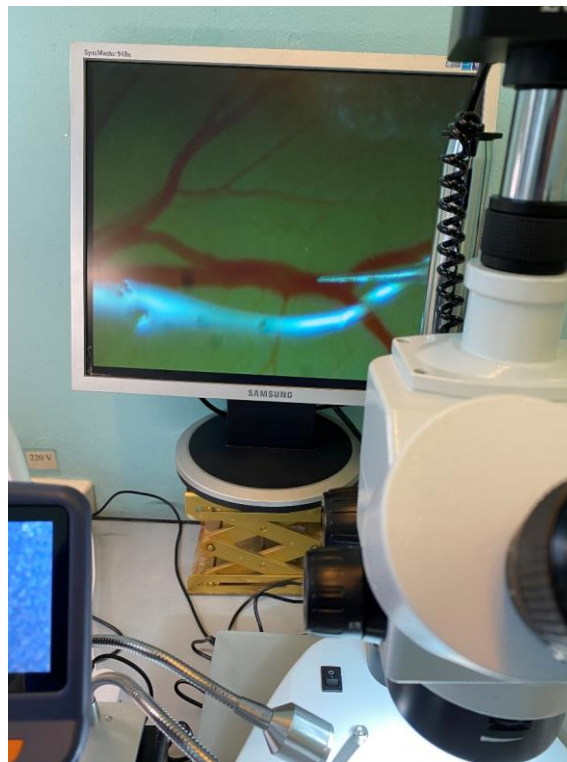


Рис. 4 Отбор пробы
крови из дорсальной
вены

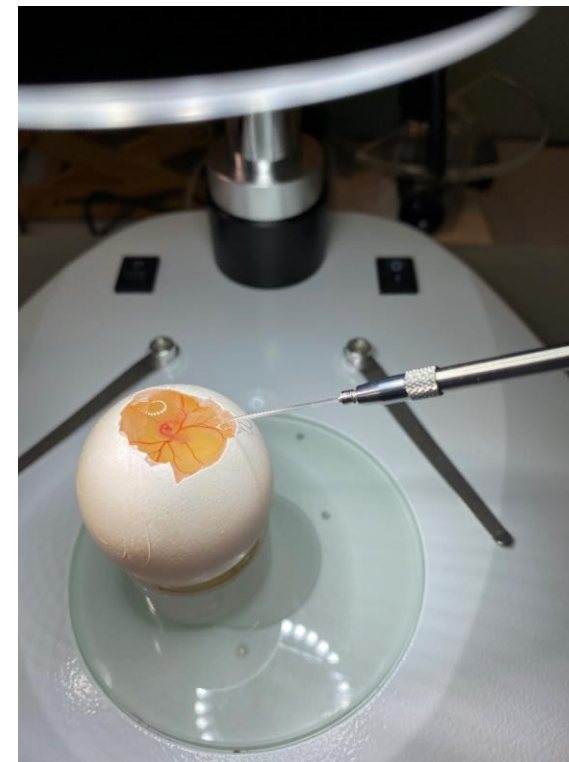


Рис. 5 Отбор пробы
под
бинокуляром методом
«*in ovo*»

Процесс микроинъекции «*in ovo*» для получения и введения PGC в/из эмбриона



Видео ролик 1

Успешность результата получения PGC от эмбрионов кур пушкинской породы в зависимости от массы яйца

Таблица – 1

Масса яйца, г	Число эмбрионов, n	Успешное взятие		Слабое развитие		Повреждение	
		n	%	n	%	n	%
45,0 – 49,9	7	3	42,9	2	28,6	2	28,6
50,0 – 54,9	103	68	66,0	17	16,5	18	17,5
55,0 – 59,9	238	171	71,9	41	17,2	26	10,9
60,0 – 64,9	200	156	78,0	34	17,0	10	5,0
65,0 – 69,9	134	97	72,4	18	13,4	19	14,2
70,0 – 74,9	83	70	84,3	7	8,4	6	7,2
75,0 и более	26	21	78,0	3	17,0	2	5,0
Всего	791	586	74,1	122	15,4	83	10,5

Сила влияния массы яйца на успешность взятия PGC $\eta^2 = 86\%$, $p\text{-value} = 0,01$, $F = 7,08$, $F_{\text{crit}} = 3,87$
(критерий Фишера)

Успешность результата получения PGC от эмбрионов кур русской белой породы в зависимости от массы яйца

Таблица – 2

Масса яйца, г	Число яиц, n	Успешное взятие		Слабое развитие		Повреждение	
		n	%	n	%	n	%
45,0 – 49,9	50	44	88,0	2	4,0	4	8,0
50,0 – 54,9	68	55	80,9	6	8,8	7	10,3
55,0 – 59,9	99	75	75,8	11	11,1	13	13,1
60,0 – 64,9	96	85	88,5	5	5,2	6	6,3
65,0 – 69,9	32	26	81,3	1	3,1	5	15,6
70,0 – 74,9	12	7	58,3	3	25,0	2	16,7
Всего	357	292	81,8	28	7,8	37	10,4

Сила влияния массы яйца на успешность взятия PGC $\eta^2 = 79\%$, $p\text{-value} = 0,05$, $F = 4,57$, $F_{\text{crit}} = 4,39$
(критерий Фишера)

Клеточные культуры в первый день и на 18 день культивирования

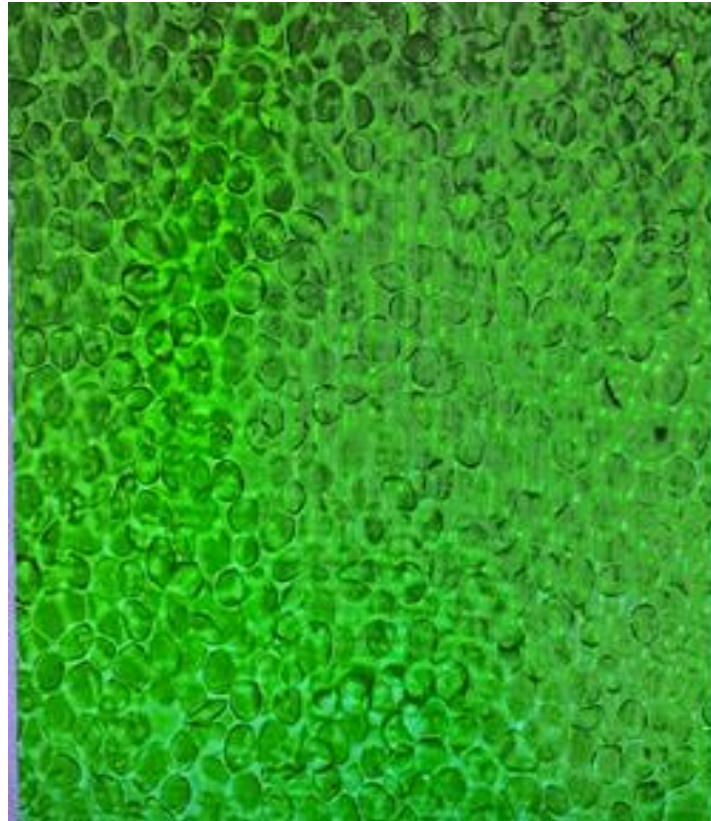


Рис. 6 Клеточные культуры в первый день взятия

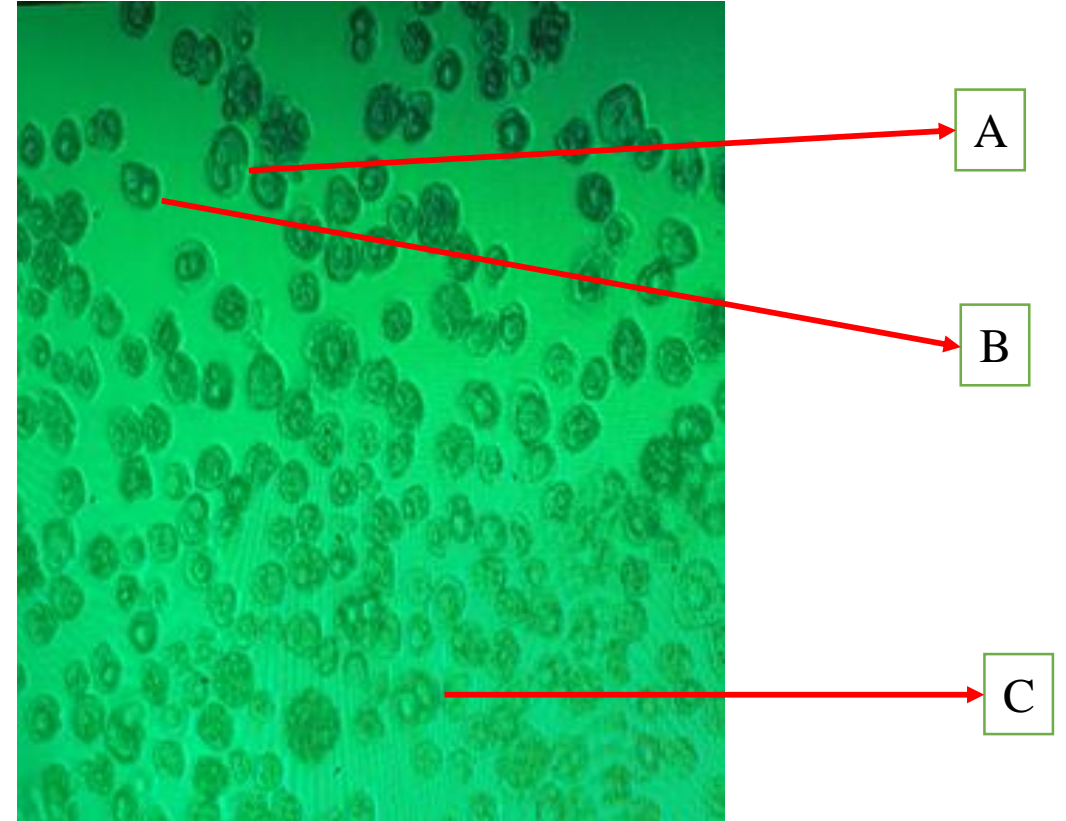


Рис. 7 18 день культивирования (А,В,С – делящиеся клетки)

Культивирование PGC в экспериментальных средах

Таблица – 3

Среда	Базовая среда (расчет на 500 мл)	Дополнительные компоненты среды	n	Концентрация PGC (млн/мл)	Концентрация живых PGC (млн/мл)
К	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher)	-	23	$1,28 \times 10^6 \pm 0,03 \times 10^6$ ^k	$0,36 \times 10^6 \pm 0,01 \times 10^6$ ^k (28%)
А	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher)	Натрия пируват, нуклеозиды, Chicken Serum – 2%, 2-меркаптоэтанол	28	$1,32 \times 10^6 \pm 0,04 \times 10^6$ ^a	$0,34 \times 10^6 \pm 0,04 \times 10^6$ ^a (26%)
Б	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher)	Натрия пируват, нуклеозиды, Chicken Serum – 2%, 2-меркаптоэтанол, антибиотик-антимикотик	27	$1,47 \times 10^6 \pm 0,03 \times 10^6$ ^b	$0,47 \times 10^6 \pm 0,07 \times 10^6$ ^b (32%)
В	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher)	Натрия пируват, нуклеозиды, Human Activin A, Human FGF-basic Recombinant Protein, Chicken Serum - 2%, 2-меркаптоэтанол, антибиотик-антимикотик	31	$2,21 \times 10^6 \pm 0,05 \times 10^6$^c	$0,84 \times 10^6 \pm 0,06 \times 10^6$ ^c (38%)

Примечание: Количество живых клеток в различных системах культивирования (время культивирования - 21 день, число экспериментов – 4). Достоверность различия сравниваемых значений (t-критерий Стьюдента) k:a, k:b, k:c, a:b, a:c, b:c, при $p \leq 0,05$.

Пролиферация и жизнеспособность PGC кур в разных средах

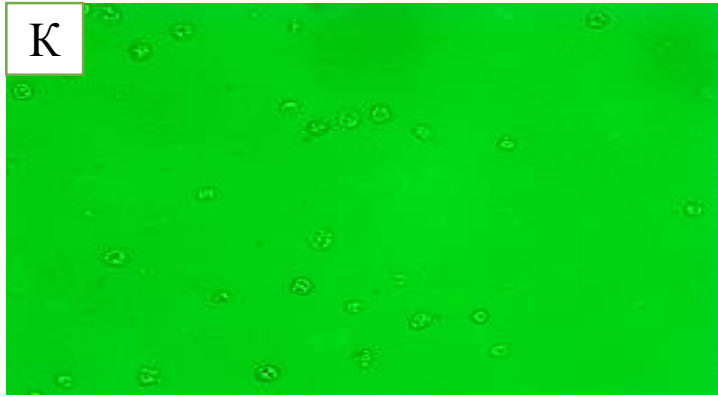


Рис. 8

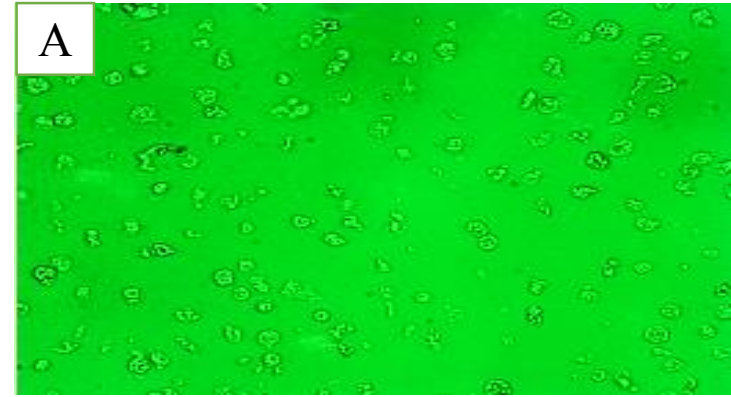


Рис. 9

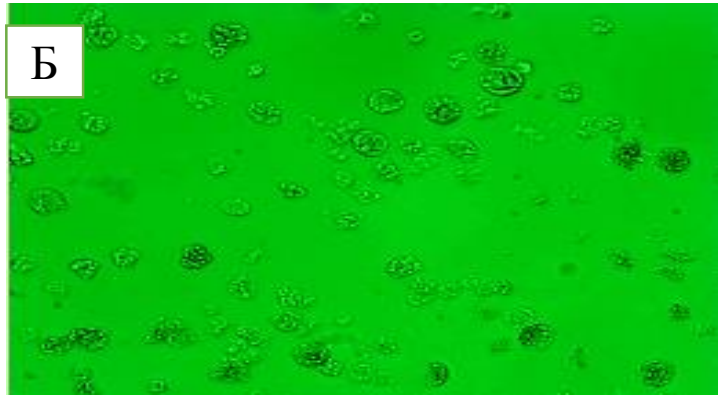


Рис. 10

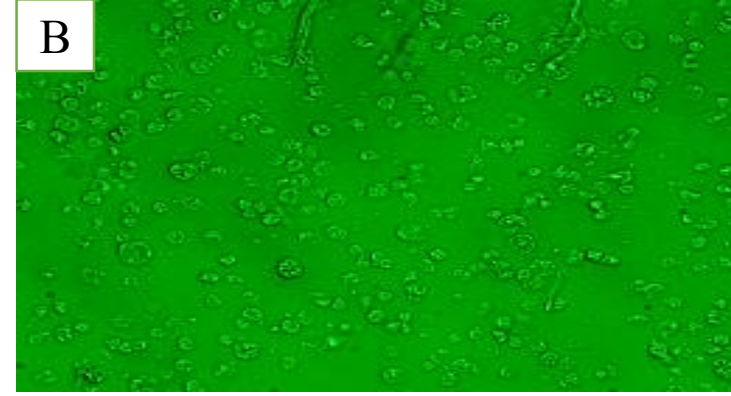


Рис. 11

Культивирование PGC в различных средах (К - контроль, А, Б, В – экспериментальные среды)
Осмотр культур проводился под инвертированным световым микроскоп LEICA DMI-8, увеличение x200
(окуляр – x10, объектив – x20)

Сравнение экспрессии специфичных для примордиальных половых клеток генов в PGC и фибробластах (контроль)

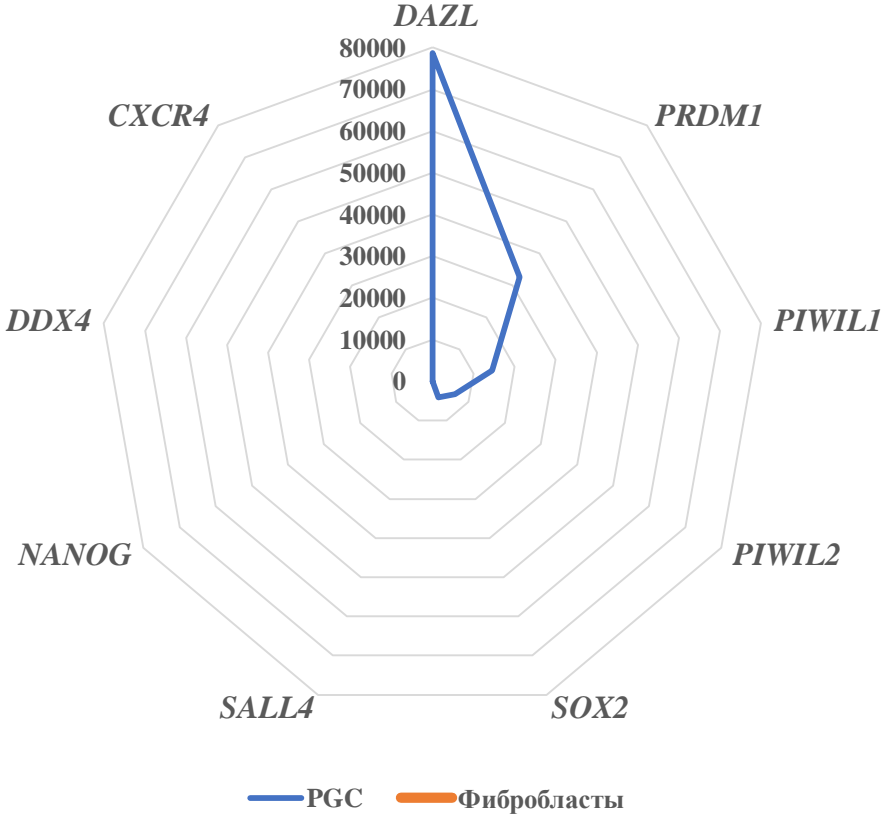


Рис. 12 Уровень экспрессии генов специфичных для PGC проведен с использованием QuantStudio Design Analysis Software v. 1.3, (n=9)

Концентрация PGC, полученных из эмбрионов обработанных бусульфаном

Таблица – 4

№ культуры	Контрольная группа			Опытная группа		
	Всего, млн/мл	Живые клетки, млн/мл	Выживаемость, %	Всего, млн/мл	Живые клетки, млн/мл	Выживаемость, %
1	1,72	1,51	87,7	4,87	4,60	94,4
2	1,43	1,27	88,7	4,61	4,15	90,0
3	1,91	1,80	94,1	3,47	3,23	93,2
4	3,37	3,06	90,7	3,31	3,23	97,7
5	2,97	2,73	92,0	3,27	3,15	96,2
6	2,17	1,88	86,8	3,36	3,02	90,0
7	2,12	1,57	74,1	3,32	2,97	89,5
8	1,98	1,58	79,9	3,21	2,96	92,2
9	2,08	1,78	85,6	3,26	2,92	89,7
10	2,98	2,58	86,6	2,98	2,71	90,8
11	2,65	2,22	84,0	2,70	6,82	91,9
12	2,33	1,83	78,6	4,28	4,87	87,9
13	2,61	1,97	75,6	4,57	5,22	87,6
14	1,77	1,40	78,9	2,35	2,90	81,0
15	3,02	2,21	73,1	4,80	5,08	94,3
Среднее	2,34	1,96^a	83,76^c	3,62	3,59^b	91,09^d

Примечание: t-критерий Стьюдента *ab, cd* при $P \leq 0,01$

Экспрессия генов специфичных для PGC (внесение бусульфана в эмбрион)

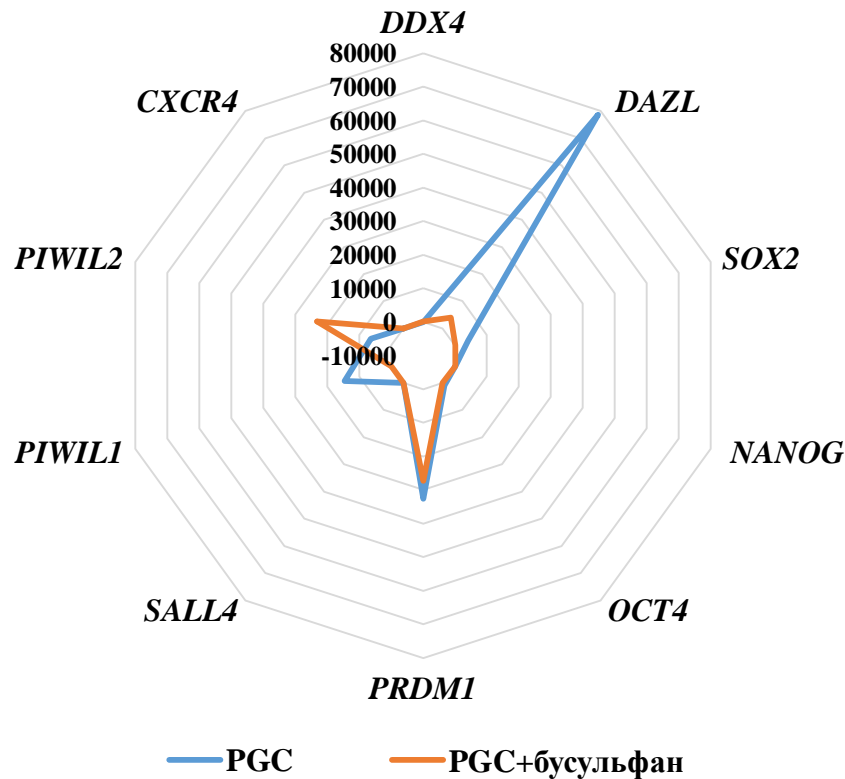


Рис. 13 Уровень экспрессии генов специфичных для PGC после обработки эмбрионов бусульфаном (75 мкг на эмбрион) проведен с использованием QuantStudio Design Analysis Software v. 1.3, (n=9)

Концентрация PGC пушкинской и русской белой пород в культурах (внесение бусульфана в культуру клеток)

PGC обработанные бусульфаном из эмбрионов кур пушкинской породы

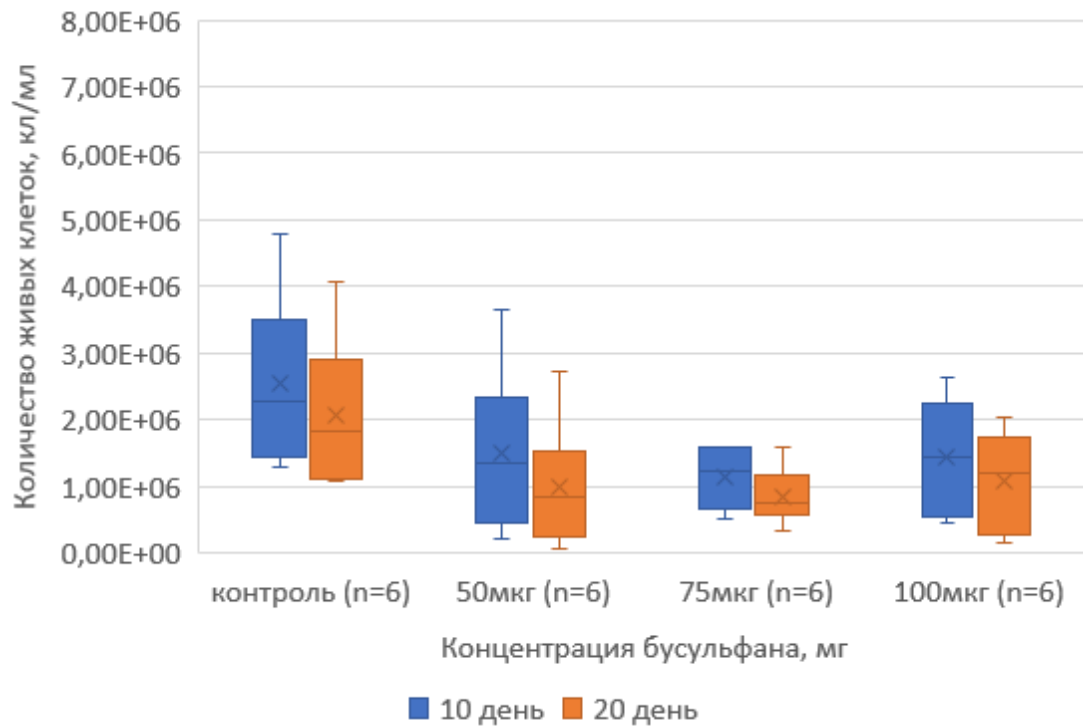


Рис.14 Примечание: достоверность разницы между контролем и 75 мкг на 20 день. t-критерий Стьюдента , $t_d=2,49$, при $P \leq 0,05$.

PGC обработанные бусульфаном из эмбрионов кур русской белой породы

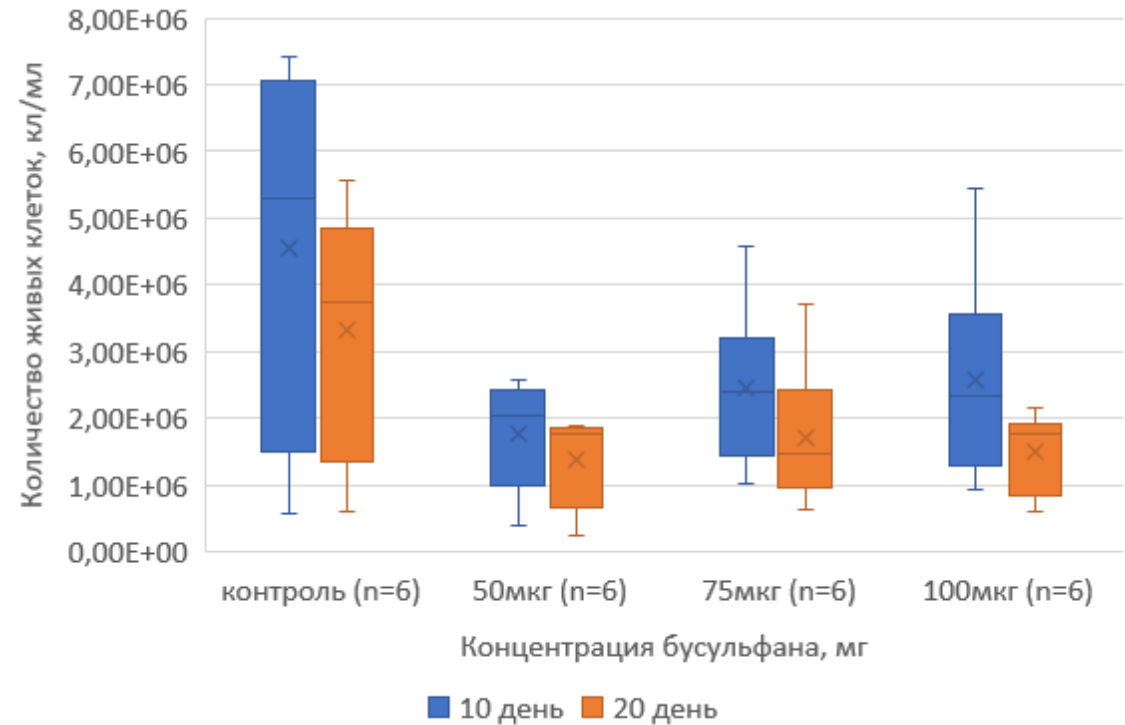


Рис. 15 Примечание: достоверной разницы между группами не выявлено.

Количественные показатели культур PGCS кур до и после криоконсервации

Таблица – 5.

№ Образца	21 день, перед заморозкой		После разморозки +4 °С		21 день, перед заморозкой		После разморозки +37 °С	
	Всего клеток, млн/мл	Живые клетки, млн/мл	Живые клетки после разморозки млн/мл	Выживаемость, %	Всего клеток, млн/мл	Живые клетки, млн/мл	Живые клетки после разморозки млн/мл	Выживаемость, %
1	1,69	1,58	0,75	47,5	2,3	1,98	0,9	45,5
2	1,75	1,43	0,71	49,7	2,5	2,10	1,1	52,3
3	1,59	1,35	0,63	46,6	1,7	1,43	0,9	62,9
4	1,86	1,75	0,61	34,8	1,9	1,75	1,1	62,8
5	1,75	1,55	0,81	52,2	2,1	1,82	1,0	54,9
M±m	1,73±0,04	1,53±0,07	0,70±0,03 ^a	46,2±3,00	2,10±0,14	1,81±0,11	1,00±0,04 ^b	55,6±3,30

Примечание: t-критерий Стьюдента ab при P≤0,01.

Количество PGCs до и после криоконсервации

Таблица 6.

№ Образца	Разморозка при +4 °С			Разморозка при +37 °С		
	Всего клеток, до заморозки млн/мл	Количество клеток, после отмывки от криопротектора		Всего клеток, до заморозки млн/мл	Количество клеток, после отмывки от криопротектора	
		млн/мл	%		млн/мл	%
1	1,69	0,9	53,0	2,3	1,6	69,5
2	1,75	0,79	45,0	2,5	1,4	56,0
3	1,59	0,9	56,6	1,7	1,1	64,7
4	1,86	0,9	48,3	1,9	1,5	78,9
5	1,75	1,00	57,0	2,1	1,5	71,4
M±m	1,73±0,04	0,90±0,03	51,9±2,34 ^a	2,10±0,14	1,42±0,08	68,1±3,79 ^b

Примечание: t-критерий Стьюдента ab, при $P \leq 0,01$.

Количественные показатели культур PGCs кур после криоконсервации

Таблица 7.

№ Образца	Разморозка при +4 °С			Разморозка при +37 °С		
	Всего клеток, млн/мл	Живые клетки, млн/мл	Выживаемость, %	Всего клеток, млн/мл	Живые клетки, млн/мл	Выживаемость, %
1	0,9	0,75	83,3	1,6	0,9	56,2
2	0,79	0,71	89,0	1,4	1,1	78,6
3	0,9	0,63	70,0	1,1	0,9	81,8
4	0,9	0,61	67,7	1,5	1,1	73,0
5	1,00	0,8	80,0	1,5	1,0	66,7
M±m	0,90±0,0^a	0,70±0,03^c	78,2±3,69	1,42±0,08^b	1,00±0,04^d	71,3±4,08

Примечание: t-критерий Стьюдента ab, cd, при $P \leq 0,01$.

Выводы

1. Выход PGCs зависит от массы яйца в каждой породе, (пушкинская от 55,0 г. и выше), (русская белая от 45,0 г. и выше).
2. Яйца с массой ниже 55,0 г не пригодны для отбора проб для дальнейшего культивирования, так как имеют слабое развитие эмбриона (стадия 9-11 НН) на 4 день (на момент отбора проб). Методом однофакторного дисперсионного анализа определена сила влияния массы яйца на успешность взятия PGCs – 86%.
3. Количество получаемых из эмбрионов PGCs от русской белой породы кур (яичная продуктивность) в 1,8 раз выше, чем из эмбрионов кур пушкинской породы (мясо – яичное направление продуктивности).
4. Разработанная нами технология получения PGCs «*in ovo*» позволяет получать клетки в высокой концентрации порядка 1,5-3,0 млн/мл, что существенно выше, чем при получении другими традиционными методами и значительно увеличивает эффективность манипуляций с примордиальными половыми клетками птиц.
5. Разработана среда для культивирования PGCs кур – многокомпонентная среда (В) на базе Opti-MEM с добавлением: натрия пируват, нуклеозиды, активин А, FGF, куриная сыворотка, меркаптоэтанол, антибиотик-антимикотик. Эффективность среды В с использованием стимуляторов пролиферации подтверждена увеличением концентрации клеток при подсчете в камере Горяева на 10 и 21 день. На 21 день концентрация клеток в культуре достигала в среднем $2,21 \times 10^6 \pm 0,05 \times 10^6$ млн/мл.

Выводы

6. Из проанализированных по уровню экспрессии генов специфичных для PGCs: *DAZL*, *SOX2*, *NANOG*, *OCT4*, *PRDM*, *SALL4*, *PIWIL1*, *PIWIL2*, наиболее информативными для идентификации PGCs являются гены *DAZL*, *PRDM1*, *PIWIL1*, *PIWIL2*, обладающие наиболее высоким уровнем экспрессии по отношению ко всем проанализированным генам.
7. Выявлен оптимальный способ деконсервации примордиальных половых клеток на водяной бане, позволяющий получать PGCs с высоким уровнем выживаемости при +4°C 46,2±3,00, при +37°C 56,6±3,30.
8. Выявлен высокий процент живых клеток после размораживания и отмывки от криопротектора +4°C 78,2±3,69, при +37°C 71,3±4,08.
9. При добавлении 75 мкг бусульфана в эмбрион количество примордиальных половых клеток увеличивается в 1,5 раза по показателю «всево клеток» – 3,62 млн/мл, что говорит о включении компенсаторных механизмов.

Спасибо за внимание!