

УДК 576.08

IN OVO — МЕТОД ВЫДЕЛЕНИЯ ПЕРВИЧНЫХ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК ИЗ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ КРОВИ ГЕНОФОНДНЫХ ПОРОД КУР

© 2025 г. Г. К. Пегливанян*, Т. А. Ларкина, Н. Р. Рейнбах, А. П. Дысин, А. В. Габова,
Е. А. Полтева, А. Е. Рябова, А. И. Азовцева

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных —
филиал Федерального исследовательского центра животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста,

Санкт-Петербург, г. Пушкин, 196601, Россия

* E-mail: Peglivanian_grig@mail.ru

Поступила в редакцию 19.03.2025

После доработки 28.05.2024

Принята к публикации 29.04.2024

Несмотря на ключевую роль примордиальных зародышевых клеток (ПЗК) в направленном изменении генома, существуют значительные трудности с эффективностью их выделения. В настоящей работе представлен новый метод (*in ovo* — внутри яйца) выделения из эмбриональной крови генофондных пород кур, который имеет важное значение для сохранения генетических ресурсов птиц и создания новых инновационных инструментов в области биотехнологии. ПЗК выделяли из крови эмбрионов кур различных пород (5 пород, 192 четырехсуточных эмбриона) и далее оценивали способность их к культивированию в течение 20 сут. Для анализа эффективности метода были проведены эксперименты по отбору проб крови у 192-х эмбрионов исследуемых пород кур и дальнейшее культивирование ПЗК. Результаты оценивали с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA. Выявлено, что эффективность отбора образцов зависит от массы яйца и породы. Самый высокий показатель эффективности выделения ПЗК демонстрировали яйца китайской шелковой породы (89.5%). Анализ данных культивирования ПЗК показал увеличение пролиферации клеток к 20-м сут. Наибольшую выживаемость наблюдали у китайской шелковой породы ($69.1 \pm 2.56\%$), у кур пород царскосельская ($68.78 \pm 3.39\%$) и род-айленд ($67.9 \pm 2.2\%$). Результаты показали пригодность метода *in ovo* для выделения ПЗК из 4-суточных эмбрионов кур и его большую эффективность, в отличие от методов, описанных в литературе.

Ключевые слова: метод *in ovo*, выделение ПЗК, генофондные породы кур, культивирование, пролиферация

Принятые сокращения: ПЗК — примордиальные зародышевые клетки.

DOI: 10.31857/S0041377125020057, EDN: FVKVDB

Домашняя курица (*Gallus gallus*) не только является важным объектом сельского хозяйства, но и представляет большую ценность в научных исследованиях, служит важной моделью в областях биологии развития, биомедицины и биопроизводства. Особенности размножения и развития кур (Petitte, Mozdziak, 2014) значительно влияют на эффективность традиционного метода работы (микроинъекции) с ДНК в клетках животных. Из-за больших различий в репродуктивной биологии между млекопитающими и птицами многие процессы работы с геномом домашней птицы требуют специальных подходов в генной инженерии.

Примордиальные зародышевые клетки (ПЗК) имеют ключевое значение для сохранения генети-

ческих ресурсов птиц и проведения трансгенных исследований, однако существуют значительные трудности с эффективностью выделения ПЗК из крови эмбрионов кур (Zhang et al., 2023; Kong et al., 2018). ПЗК являются предшественниками мужских и женских гамет. ПЗК эмбриона были обнаружены в гипобласте и эпибласте *zona pellucida* бластодермы стадии Х. На ранних стадия эмбриогенеза, до стадии IV Гамбургера–Гамильтона (Hamburger–Hamilton, HH), ПЗК в основном мигрируют из *zona pellucida* в зародышевую область полумесяца (Macdonald et al., 2010).

ПЗК, расположенные между слоями энтодермы и эктодермы, а также в просвете кровеносных сосудов, обычно имеют сферический профиль. Иногда в некоторых мигрирующих ПЗК

наблюдаются псевдоподии, что свидетельствует о морфологических изменениях в зависимости от их локализации. Средний диаметр ПЗК составляет около 14 мкм, а некоторые из них достигают 20 мкм на стадии разделения. Клетка имеет неровную форму с цитоплазматическими ворсинками. Электронная микроскопия (Fujimoto et al., 1976) позволила выявить особенность нуклеолы в ПЗК, характеризующуюся многочисленными фрагментированными электронно-непрозрачными вкраплениями. Эти фрагментированные нуклеолы окрашиваются пиронином и эозином, что характерно для нуклеолярного вещества. Этот уникальный признак присутствует в течение всего цикла пролиферации ПЗК и помогает идентифицировать этот вид клеток. В цитоплазме ПЗК преобладают свободные рибосомы, часто в виде полисом. Микротрубочки, хотя и не всегда присутствуют, могут быть замечены в цитоплазме в случайном порядке. Гликоген, используемый для идентификации ПЗК, проявляется на электронных микрофотографиях в виде непрозрачных частиц размером около 50 нм, либо изолированных, либо сгруппированных в цитоплазме.

Морфологические характеристики ПЗК, такие как сферическое ядро с отдельным нуклеолом, преобладание множества липидных частиц в цитоплазме и характерная крупная морфология, обычно наблюдаются и сохраняются среди различных видов птиц. К ним относятся перепела, утки, голуби, фазаны и другие виды. В целом морфологические характеристики ПЗК остаются неизменными на протяжении всего их миграционного пути, а отличительные особенности помогают в их идентификации и дифференциации от других типов клеток, в том числе и от клеток крови (Mathan et al., 2023).

Данные экспрессии генов-маркеров ПЗК идентифицируют и подтверждают (Баркова и др., 2023), их наличие в культуре клеток. Другое исследование фокусировалось на белке DAZL, который также был обнаружен в ПЗК птиц. DAZL, специфический для ПЗК РНК-связывающий белок, локализуется в зародышевой плазме у некоторых позвоночных (Maegawa et al., 1999; Houston, King, 2000). Удаление этого белка вызывает нарушения в развитии ПЗК (апоптоз и аномальную экспрессию генов, характерных для ПЗК), что указывает на его важную роль в этом процессе (Lee et al., 2016).

ПЗК можно выделить из трех различных стадий развития НН эмбриона: на стадии зародышевого полумесяца 4—8, кровеносной системы 14—16 и из гонад стадий 26—28. Существуют несколько методов выделения ПЗК, один из них — метод центрифугирования в градиенте плотности с помощью фикола, перколла, никоденица (Yasuda et al., 1992; Zhang et al., 2023) или лизирующего буфера с хлоридами аммония и калия (Chojnacka-Puchta et al., 2015). От эмбрионов птиц можно получить в среднем от 500 до 2000 ПЗК, однако метод выделения в градиенте плотности влияет на дальнейшую пролиферативную функцию клеток.

При использовании этого метода было получено мало клеток на 15-е сут культивирования (5×10^4) (Han, Park, 2018). Другие авторы для выделения первичных зародышевых клеток использовали сортировку клеток — магнитно-активированную (MACS) и флуоресцентно-активированную (FACS), но количество выделенных клеток тоже было очень малым (Kang et al., 2009).

Существуют альтернативные методы выделения ПЗК (*in vitro*), когда яйцо полностью вскрывается и эмбрион с желтком переносится в специализированную кювету для отбора клеток (Perry, 1988; Ono, 2000; Han et al., 2002). В отличие от метода *in vitro*, в нашем оптимизированном методе *in ovo* целостность оболочной мембраны яйца не нарушается, и тем самым минимизируются травмируемость и контаминация эмбриона (Крутикова, Пегливанян, 2025).

ПЗК кур являются полезным инструментом для сохранения пород птиц путем криоконсервации и биобанкинга, а также для введения мутации в геном кур с помощью геномного редактирования (Whyte et al., 2015).

Ранее нами (Пегливанян и др., 2024) оптимизированы протоколы криоконсервации и последующего размораживания первичных половых клеток кур. Выявлено, что при разморозке 37 °С максимальная жизнеспособность клеток составила 62,9 %. Проведенное исследование дает возможность сохранять и использовать ПЗК в последующих научных задачах для восстановления популяций уникальных пород кур с целью использования их генетического потенциала.

Цель настоящей работы — оценить и сравнить эффективность получения и культивирования ПЗК у различных пород кур с использованием метода *in ovo*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Получение ПЗК. Исследования проводили на базе биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ «Генетическая коллекция редких исчезающих пород кур» (г. Пушкин, Санкт-Петербург). ПЗК получали от 4-суточных эмбрионов ($n = 192$) пушкинской, русской белой, царскосельской, род-айленд и китайской шелковой пород кур. Отбор проб крови объемом 3—5 мкл из дорсальной аорты эмбриона осуществляли через полученное отверстие под лупой (бинокулярный микроскоп MC-20 ZOOM, Россия) с помощью иглы диаметром 30 мкм микроинъектора (Narishige IM-11-2, Japan) (рис. 1).

Заранее подготовленную культуральную среду (300 мкл) в пробирках Eppendorf объемом 1.5 мл помещали в термощкаф (ТС-1/20 СПУ, Россия) при температуре 37 °С. Пробы крови, взятые из эмбрионов, добавляли в пробирки с культуральной средой и хранили в термощкафу до момента их переноса на культуральный планшет.

Культивирование ПЗК. Базовой основой среды для культивирования ПЗК кур служила среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) (Gibco, Thermo Fisher, США), со-

держащая следующие компоненты: 1 М пирувата натрия (Applichem, Германия); 0.01 %-ный 2-меркаптоэтанол (VWR International, США); нуклеозиды (Embryo Max Nucleosides 100-кратные, (Millipore, США) в разведении до 1-кратности; 2 % куриную сыворотку; антибиотик-антимикотик 100-кратный в разведении до 1-кратности; 25 нг/мкл рекомбинантного Activin A человека; 10 нг/мкл рекомбинантного основного фактора роста фибробластов человека FGF-2/bFGF (все от Gibco, Thermo Fisher, США).

Для культивирования ПЗК использовали 48-луночные планшеты Nunc Cell-Culture Treated Multidishes с гидрофильной адгезивной поверхностью (ThermoFisher, США). Это покрытие, содержащее гидроксильные группы, позволяет клеткам, которые нуждаются в прикреплении к поверхности для своего роста, адгезировать при температуре 37 °С. При понижении температуры до комнатной, клетки легко отделяются от поверхности, что упрощает их отбор. Затем планшет размещается на термостойке (столик Морозова) для подогрева до 37 °С и соблюдения оптимальных условий для адгезии клеток.

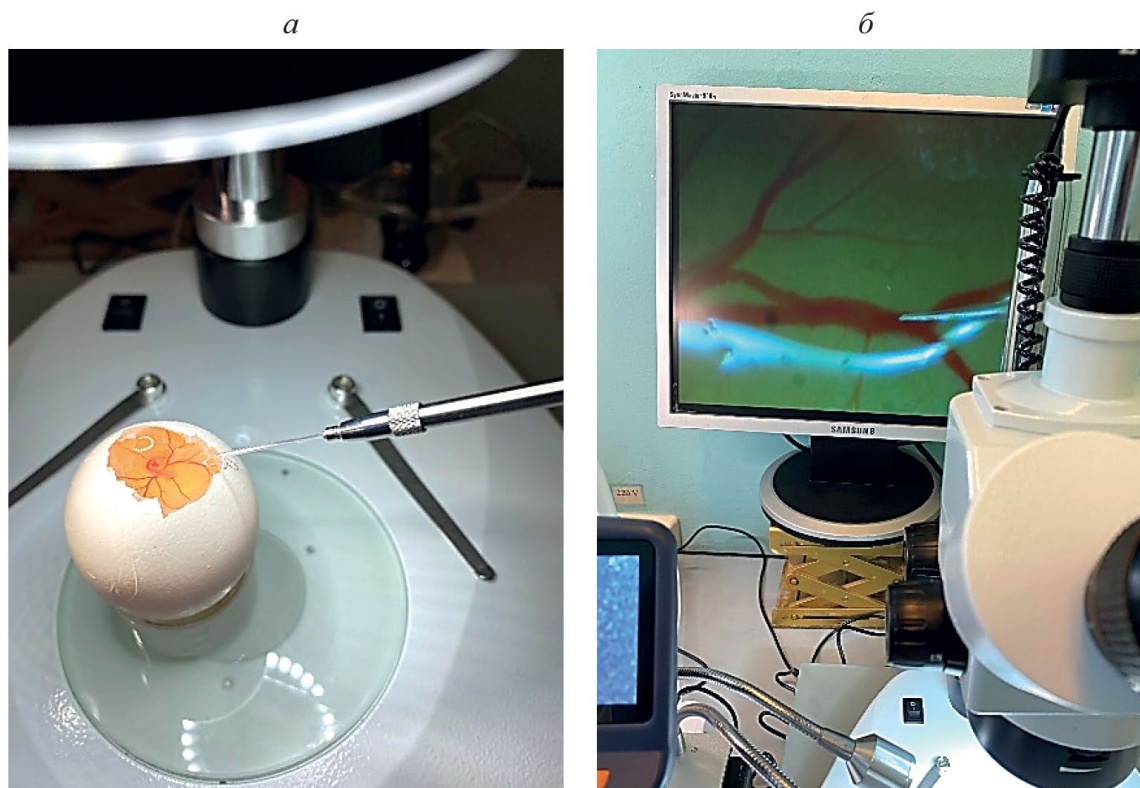


Рис. 1. Демонстрация отбора крови способом *in ovo*. *а* — Четырехсуточный эмбрион. *б* — Расположение под бинокуляром и подведение микроиглы; контроль микроинъекции под видеокамерой.

Каждые 2 сут проводили осмотр культур под инвертированным световым микроскопом LEICA DM18 (LEICA, Германия) при увеличении объектива и окуляра 40× и 10× соответственно. Замену половины культуральной среды в каждой лунке проводили в стерильных условиях: стерильным типсом по стенке лунки с поверхности культуры медленно, чтобы не захватить клетки, отбирали 150 мкл среды и также медленно по стенке вводили 150 мкл свежеприготовленной среды, каждые 2 сут. Для подсчета клеток отбирали 10 мкл суспензии в пробирки объемом 0.5 мл для определения итогового количества клеток и оценки жизнеспособности. Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию трипановым синим (0.4 %). Пролиферацию оценивали с помощью подсчета клеток по мере культивирования. Клетки считали в камере Горяева по стандартной методике. Использовали формулу $N = k \cdot n \cdot 10^4$, где N — число клеток в 1 мл, n — число клеток в 25 больших квадратах камеры Горяева, k — коэффициент разведения. Анализ данных и их визуализация проведены с использованием описательной статистики в программе MS Excel.

Статистическая оценка влияния факторов. Выявление наиболее значимых факторов и их влияние на результирующий признак и проводили с применением однофакторного дисперсионного анализа ANOVA (ANALYSIS OF VARIANCE) по формуле

$$\eta_f^2 = SS_f / SS_r,$$

где η_f^2 — сила влияния фактора; SS_f — случайная (внутригрупповая) дисперсия или сумма квадратов центральных отклонений от частной средней; SS_r — общая дисперсия или сумма квадратов центральных отклонений от общей средней всего комплекса. Проверку значимости влияния факторов определяли с помощью статистического критерия Фишера по формуле

$$F = \sigma_f^2 / \sigma_r^2,$$

где F — эмпирический критерий достоверности силы влияния; σ_f^2 — факториальная межгрупповая дисперсия; σ_r^2 — случайная внутригрупповая дисперсия.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе проведенной работы были отобраны ПЗК от 192 эмбрионов генофондных пород кур: пушкинская ($n = 34$), царскосельская ($n = 29$), род-айленд ($n = 52$), русская белая ($n = 39$), китайская шелковая ($n = 38$). Отбор ПЗК проводили

с использованием разработанного метода *in ovo* (Крутикова, Пегливанян, 2025).

В табл. 1 приведены показатели силы влияния массы яйца на успешность взятия образцов крови из эмбрионов кур различных пород.

Пушкинская порода. Было установлено, что сила влияния массы яйца на успешность взятия образцов крови у эмбрионов кур пушкинской породы составила 95 % (p -value < 0.002). Во всех весовых группах яиц взятие образцов крови было успешным (75 % и выше). Наиболее успешное взятие отмечено у яиц массой 65.0—69.9 г. Общая успешность взятия образцов у пушкинской породы составила 79.4 %. При этом у 20.6 % эмбрионов пробы крови не были взяты, из которых 8.8 % составляли эмбрионы со слабым развитием, а 11.8 % были повреждены при отборе проб.

Царскосельская порода. Оказалось, что при силе влияния массы яйца на успешность взятия образца крови 99.8 % значение p -value < 7.86 , а значит, масса яиц у этой породы не является значимым фактором при отборе проб крови. Следует отметить также малую долю поврежденных эмбрионов — 3.4 % и отсутствие эмбрионов со слабым развитием (см. табл. 1). Кровеносная система эмбриона царскосельской породы хорошо развита, что способствует лучшему отбору проб крови. В связи с этим в исследуемой выборке отсутствовали слабо развитые эмбрионы, поэтому не было связи массы яйца с успешностью взятия образца крови.

Порода род-айленд. В этом случае показатель η^2 составил 95 % (p -value < 0.004), а наиболее успешными для взятия оказались яйца массой 50.0—54.9 г. Общая успешность взятия крови у этой породы составила 76.9 %. Кровеносная система этих эмбрионов по сравнению с другими исследуемыми породами отличается хорошо оформленными сосудами, что способствует быстрому отбору проб крови.

Русская белая порода. Оптимальная масса яйца у этой породы кур для успешного взятия крови 50.0—54.9 г. В среднем по всем категориям яиц успешность получения крови составила 69.2 %. Достоверно значимой связи массы яйца ($\eta^2 = 73$ %) с успешностью взятия образца крови не обнаружено. Сосуды эмбрионов породы русская белая слабо развиты, что затрудняет взятие проб крови.

Китайская шелковая порода. Самым успешным взятием крови из этих эмбрионов — 93.8 % — отмечены яйца массой 40.0—44.9 г. Среднее значение по всем весовым категориям яиц успешности взятия крови составила 89.5 %. Сила влияния массы

Таблица 1. Сила влияния массы яйца на успешность взятия образцов крови из эмбрионов кур различных пород

Масса яйца, г	Число эмбрионов, <i>n</i>	Успешное взятие образца крови		Слабо развитые эмбрионы <i>n</i>	Поврежденные эмбрионы		
		<i>n</i>	%		%	<i>n</i>	%
Пушкинская							
50.0—54.9	1	1	100	0	0	0	0
55.0—59.9	13	10	76.9	1	7.7	2	15.4
60.0—64.9	10	8	80	2	20	0	0
65.0—69.9	6	5	83.3	0	0	1	16.7
70.0—74.9	4	3	75	0	0	1	25
Всего	34	27	79.4	3	8.8	4	11.8
Достоверность	η² = 95%, <i>p</i> -value <0.002; <i>F</i> = 23.6 (критерий Фишера)						
Царскосельская							
50.0—54.9	1	1	100	0	0	0	0
55.0—59.9	14	14	100	0	0	0	0
60.0—64.9	6	6	100	0	0	0	0
65.0—69.9	7	6	85.7	0	0	1	14.3
70.0—74.9	1	1	100	0	0	0	0
Всего	29	28	96.6	0	0	1	3.4
Достоверность	η² = 99.8%; <i>p</i> -value <7.86; <i>F</i> = 569 (критерий Фишера)						
Род-Айленд							
45.0—49.9	9	6	66.7	1	11.1	2	22.2
50.0—54.9	26	21	80.8	1	3.8	4	15.4
55.0—59.9	13	10	76.9	0	0	3	23.1
60.0—64.9	4	3	75	1	25	0	0
Всего	52	40	76.9	3	5.8	9	17.3
Достоверность	η² = 95%; <i>p</i> -value <0.004; <i>F</i> = 27.2 (критерий Фишера)						
Русская белая							
50.0—54.9	10	8	80	0	0	2	20
55.0—59.9	14	10	71.4	3	21.4	1	7.2
60.0—64.9	9	5	55.6	2	22.2	2	22.2
65.0—69.9	6	4	66.6	1	16.7	1	16.7
Всего	39	27	69.2	6	15.4	6	15.4
Достоверность	η² = 73%; <i>p</i> -value <0.13; <i>F</i> = 3.57 (критерий Фишера)						
Китайская шелковая							
35.0—39.9	16	14	87.5	1	6.25	1	6.25
40.0—44.9	16	15	93.8	1	6.2	0	0
45.0—49.9	6	5	83.3	1	16.7	0	0
Всего	38	34	89.5	3	7.9	1	2.6
Достоверность	η² = 98%; <i>p</i> -value <0.004; <i>F</i> = 63.5 (критерий Фишера)						

яйца на этот показатель составила 98 %. В отличие от других исследуемых пород, китайская шелковая является декоративной и характеризуется самым низким показателем массы яйца. Но несмотря на это, успешность взятия проб крови оказалась высокой по всем весовым группам яиц.

Таким образом, оптимальная масса яйца для отбора образцов крови кур исследуемых пород является вариabельным показателем и зависит от принадлежности к той или иной породе. Главным критерием при отборе проб крови является хорошо развитая кровеносная система эмбриона, которая не зависит от направления продуктивности пород.

Выживаемость и пролиферация ПЗК в культуре.

Основным этапом получения ПЗК кур является культивирование образцов крови, полученных из дорсальной аорты на стадии 14–16 НН. Сразу после взятия образца крови из эмбриона ПЗК невозможно визуализировать, так как содержится большое количество форменных элементов крови (Tsunekawa et al., 2000). Через 10–15 сут культивирования форменные элементы крови полностью

элиминируют и в культуре остаются только ПЗК, которые легко визуализировать (рис. 2).

В табл. 2 сравниваются доли живых и мертвых ПЗК, а также их выживаемость на 10-е и 20-е сут культивирования. Через 10 сут самую высокую концентрацию живых ПЗК наблюдали у китайской шелковой породы (1.16 ± 0.15 млн/мл), а самую низкую — у пушкинской породы (0.58 ± 0.11 млн/мл). К 20-м сут концентрация живых клеток увеличилась у всех пород, при этом у китайской шелковой породы она по-прежнему была самой высокой (1.45 ± 0.19 млн/мл). Уровень выживаемости ПЗК различался у исследуемых пород, но в целом повышался к 20-м сут. Самая высокая выживаемость на 10-е сут была у русской белой породы (66.6 ± 2.03 %), а самая низкая — у царскосельской (57.74 ± 3.37 %). К 20-м сут выживаемость ПЗК всех пород увеличилась с небольшими вариациями. ПЗК китайской шелковой породы отличались самой высокой выживаемостью (69.1 ± 2.56 %), что указывает на лучшие адаптивные способности ПЗК этой породы к условиям культивирования в используемой среде.

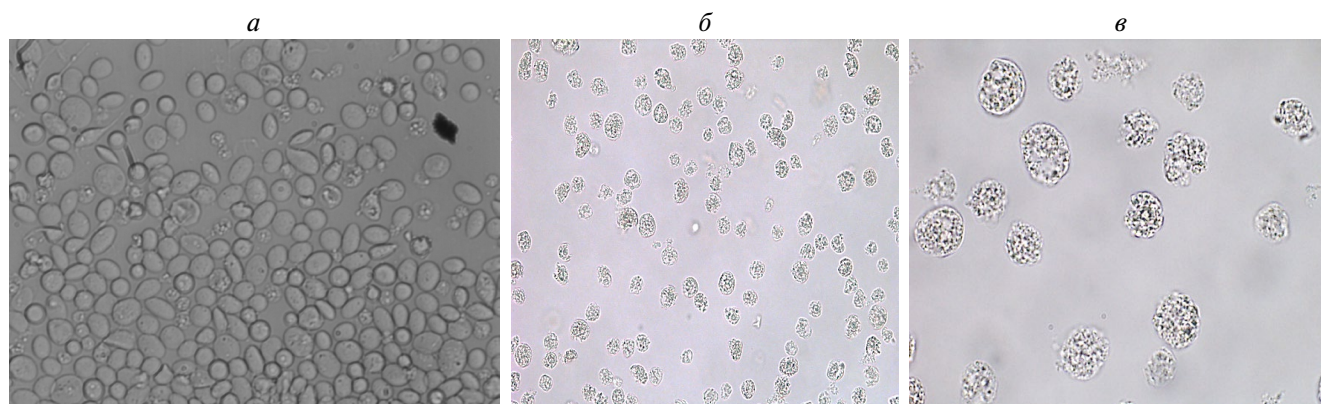


Рис. 2. Вид клеточных культур в первые сутки взятия крови (а) и на 15-е сут культивирования (б, в). а — С форменными элементами крови и ПЗК; б, в — только ПЗК. Микроскоп LEICA DMI8 (Nicon, Германия), об. 40× (а, б) и флуоресцентный микроскоп AXIOVERT 200M с цветной цифровой камерой высокого разрешения DFC420 (Германия), об. 100× (в).

Таблица 2. Численность (млн в 1 мл) живых и мертвых ПЗК на 10-е и 20-е сут культивирования

Порода (n = 10)	10-е сут			20-е сут		
	Живые	Мертвые	Выживаемость, %	Живые	Мертвые	Выживаемость, %
Китайская шелковая	1.16 ± 0.15	0.66 ± 0.08	62.18 ± 2.10	1.45 ± 0.19	0.68 ± 0.1	69.1 ± 2.56
Пушкинская	0.58 ± 0.11	0.32 ± 0.04	63.32 ± 2.10	0.96 ± 0.15	0.53 ± 0.09	65.03 ± 1.77
Род-Айленд	0.62 ± 0.15	0.33 ± 0.06	63.69 ± 3.07	1.08 ± 0.25	0.54 ± 0.14	67.9 ± 2.52
Царскосельская	0.85 ± 0.11	0.60 ± 0.07	57.74 ± 3.37	1.02 ± 0.16	0.52 ± 0.11	68.78 ± 3.39
Русская белая	0.60 ± 0.10	0.29 ± 0.05	66.6 ± 2.03	0.84 ± 0.15	0.45 ± 0.08	65.16 ± 2.67

Таким образом, предложенная оптимизированная технология выделения (*in ovo*) и дальнейшего культивирования оказалась эффективной и позволяет получать ПЗК из эмбрионов кур в концентрации от 0.84 до 1.45 млн/мл, что существенно больше, чем при получении другими традиционными методами. Отметим, что эффективность выделения и культивирования ПЗК имеет важное значение, поскольку обеспечивает сохранность жизнеспособных клеток, что является важным этапом при редактировании генома кур (Challagulla et al., 2023).

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность А. М. Кольцовой (Институт цитологии РАН) за помощь в получении микрофотографий.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 24-16-00133, <https://rscf.ru/project/24-16-00133/>).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Все эксперименты с животными проводились в соответствии с Хельсинкской декларацией 2013 года и были одобрены комиссией по этике Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиала Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста» (протокол № 2020-4 от 3 марта 2020 г., Санкт-Петербург, Пушкин, Россия).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Баркова О. Ю., Ларкина Т. А., Крутикова А. А., Пегливанян Г. К. 2023. Идентификация примордиальных зародышевых клеток (PGC) кур пушкинской породы с помощью ПЦР в реальном времени. Птицеводство. № 1. С. 10—15 (Barkova O. Y., Larkina T. A., Krutikova A. A., Peglivanyan G. K. 2023.

Identification of primordial germ cells (PGC) of Pushkin breed chickens by real-time PCR. Poultry Science. № 1. P. 10.) <https://doi.org/10.33845/0033-3239-2022-72-1-10-15>

Крутикова А. А., Пегливанян Г. К. 2025. Способ получения примордиальных половых клеток птиц. Патент № 2832977 С1, Российская Федерация, МПК C12N5/07, C12N5/10, C12N5/16. (Krutikova A. A., Peglivanyan G. K. 2025. Method of obtaining primordial germ cells of birds. Patent No. 2832977 C16, Russian Federation, IPC C12N5/07, C12N5/10, C12N5/16.)

Пегливанян Г. К., Ларкина Т. А., Рейнбах Н. Р., Полтева Е. А., Дысин А. П., Рябова А. Е., Азовцева А. И., Крутикова А. А. 2024. Особенности криоконсервации и декриоконсервации примордиальных половых клеток пушкинской породы кур. Биотехнология. 2024. Т. 40. № 5. С. 29. (Peglivanyan G. K., Larkina T. A., Reynbach N. R., Polteva E. A., Dysin A. P., Ryabova A. E., Azovtseva A. I., Krutikova A. A. 2024. Features of cryopreservation and decryoconservation of primordial germ cells of the Pushkin chicken breed. Biotechnology. 2024. V. 40, no. 5. P. 29.) <https://doi.org/10.56304/S0234275824050090>

Challagulla A., Jenkins K. A., O'Neil T. E., Morris K. R., Wise T. G., Tizard M. L., Bean A. G. D., Schat K. A., Doran T. J. 2023. Germline engineering of the chicken genome using CRISPR/Cas9 by *in vivo* transfection of PGCs. Animal Biotechnol. V. 34. P. 775—784. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1789869>

Chojnacka-Puchta L., Sawicka D., Lakota P., Plucieniczak G., Bednarczyk M., Plucienniczak A. 2015. Obtaining chicken primordial germ cells used for gene transfer: *in vitro* and *in vivo* results. J. Applied Genetics. V. 56. P. 493. <https://doi.org/10.1007/s13353-015-0276-7>

Fujimoto T., Ukeshima A., Kiyofuji R. 1976. The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. Anat. Record. V. 185. P. 139. <https://doi.org/1002/ar.1091850203>

Han J. Y., Park Y. H. 2018. Primordial germ cell-mediated transgenesis and genome editing in birds. J. Animal Sci. Biotechnol. V. 9. P. 1. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0234-4>

Han J. Y., Park T. S., Hong Y. H., Jeong D. K., Kim J. N., Kim K. D., Lim J. M. 2002. Production of germline chimeras by transfer of chicken gonadal primordial germ cells maintained *in vitro* for an extended period. Theriogenology. V. 58. P. 1531. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)01061-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)01061-0)

Houston D. W., King M. L. 2000. A critical role for Xdazl, a germ plasm-localized RNA, in the differentiation of primordial germ cells in *Xenopus*. Development. V. 127. Art. ID: 447. <https://doi.org/10.1242/dev.127.3.447>

Kang S. J., Choi J. W., Park K. J., Lee Y. M., Kim T. M., Sohn S. H., Han J. Y. 2009. Development of a pheasant

- interspecies primordial germ cell transfer to chicken embryo: Effect of donor cell sex on chimeric semen production. *Theriogenology*. 2009. V. 72. P. 519. <https://doi.org/10.1016/j.2009.04.007>
- Kong L., Qiu L., Guo Q., Chen Y., Zhang X., Chen B., Chang G. 2018. Long-term in vitro culture and preliminary establishment of chicken primordial germ cell lines. *PLoS One*. V. 13. Art. ID: e0196459. <https://doi.org/10.1371/0196459>
- Lee H. C., Choi H. J., Lee H. G., Lim J. M., Ono T., Han J. Y. 2016. DAZL expression explains origin and central formation of primordial germ cells in chickens. *Stem Cells Devel.* V. 25. P. 68–79. <https://doi.org/10.1089/scd.2015.0208>
- Macdonald J., Glover J. D., Taylor L., Sang H. M., McGrew M. J. 2010. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PloS one*. V. 5. Art. ID: e15518. <https://doi.org/10.1371/0015518>
- Maegawa S., Yasuda K., Inoue K. 1999. Maternal mRNA localization of zebrafish DAZ-like gene. *Mech. Devel.* V. 81. P. 223. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(98\)00242-1](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(98)00242-1)
- Mathan, Zaib G., Jin K., Zuo Q., Habib M., Zhang Y., Li B. 2023. Formation, application, and significance of chicken primordial germ cells: *Rev. Animals*. V. 13. Art. ID: 1096. <https://doi.org/10.3390/13061096>
- Ono T. Exo ovo culture of avian embryos. 2000. *Dev. Biol. Protocols*. V. I. P. 39. <https://doi.org/10.1385/1-59259-685-1:39>
- Perry M. M. 1988. A complete culture system for the chick embryo. *Nature*. V. 331. P. 70.
- Petitte J. N., Mozdziaik P. E. 2014. Production of transgenic poultry. In: *Transgenic Animal Technol.*: Elsevier. P. 335. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410490-7.00012-8>
- Rengaraj D., Won S., Han J. W., Yoo D., Kim H., Han J. Y. 2020. Whole-transcriptome sequencing-based analysis of DAZL and its interacting genes during germ cells specification and zygotic genome activation in chickens. *Int. J. Mol. Sci.* V. 21. Art. ID: 8170. <https://doi.org/10.3390/ijms21218170>
- Tsunekawa N., Naito M., Sakai Y., Nishida T., Noce T. 2000. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development*. V. 127. P. 2741. <https://doi.org/10.1242/dev.127.12.2741>
- Zhang X., Xian R., Fu Y., Dai Y., Peng R. 2023. A novel, efficient method to isolate chicken primordial germ cells from embryonic blood using cell culture inserts. *Animals*, V. 13. Art. ID: 3805. <https://doi.org/10.3390/13243805>
- Yasuda Y., Tajima A., Fujimoto T., Kuwana T. 1992. A method to obtain avian germ-line chimerae using isolated primordial germ cells. *J. Reprod. Fert.* V. 96. P. 521. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0960521>
- Whyte J., Glover J. D., Woodcock M., Brzeszczynska J., Taylor L., Sherman A., Kaiser P., McGrew M. J. 2015. FGF, insulin, and SMAD signaling cooperate for avian primordial germ cell self-renewal. *Stem Cell Reports*. V. 5. P. 1171. <https://doi.org/10.1016/j.2015.10.008>

IN OVO — ISOLATION OF PRIMORDIAL GERM CELLS FROM EMBRYONIC BLOOD OF GENE POOL BREEDS OF CHICKENS

G. K. Peglivanyan*, T. A. Larkina, N. R. Reinbach, E. A. Polteva, A. P. Dysin, A. V. Gabova,
A. E. Ryabova, A. I. Azovtseva

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry (RRIFAGB), St. Petersburg, Pushkin, 196601, Russia

* e-mail: Peglivanian_grig@mail.ru

The article presents a new method (in ovo — inside the egg) for isolating primordial germ cells (PGC) from embryonic blood of gene pool chicken breeds, which is of great importance for preserving the genetic resources of birds and creating new innovative tools in the field of biotechnology. Despite the key role of PGC in the targeted modification of the genome, there are significant difficulties with the efficiency of their isolation. To analyze the efficiency of the in ovo method, experiments were conducted on collecting blood samples from 192 chicken embryos of various breeds, as well as subsequent cultivation of PGC and cell counting. It was found that the efficiency of sampling depends on the egg weight and breed. A high efficiency rate was observed in the Chinese Silkie breed (89.5%), with an influence strength of $\eta^2 = 98\%$, p -value < 0.004 . Analysis of PGC cultivation data showed an increase in the concentration of living cells and their survival by the 20th day. The highest survival rates were observed in the Chinese Silkie breed ($69.1 \pm 2.56\%$), and the Tsarskoye Selo ($68.78 \pm 3.39\%$) and Rhode Island ($67.9 \pm 2.52\%$) chicken breeds also had high rates. The results confirmed the importance of the in ovo method for optimizing the process of isolating PGCs from 4-day chicken embryos to increase the number of cells during further cultivation.

Keywords: in ovo assay, PGCs isolation, chicken gene pool breeds, cell culture, proliferation