

УДК 576.08+575.1

## РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПОЛУЧЕНИЯ И КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПРИМОРДИАЛЬНЫХ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК (PGC) КУР ПУШКИНСКОЙ ПОРОДЫ

© 2022 г. Т. А. Ларкина<sup>1</sup>, \*, А. А. Крутикова<sup>1</sup>, Г. К. Пегливанян<sup>1</sup>,  
Е. А. Полтева<sup>1</sup>, Ю. С. Щербаков<sup>1</sup>, О. Ю. Баркова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>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”, Пушкин, Санкт-Петербург, 196601 Россия

\*e-mail: tanya.larkina2015@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.03.2022 г.

После доработки 08.04.2022 г.

Принята к публикации 16.04.2022 г.

Примордиальные зародышевые клетки (PGC) являются предшественниками яйцеклеток и сперматозоидов и их удобно использовать для культивирования и генетической модификации *in vitro*. При разработке технологических подходов процесса получения и культивирования PGC использовали четыре варианта культуральных сред. Выявлено, что наиболее эффективной из них оказалась бессывороточная базовая среда KnockOut DMEM/F-12, без L-глутамина с добавлением факторов роста Activin A и FGF-2/bFGF, обеспечивающая высокий рост и пролиферацию клеток PGC кур породы пушкинская из биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ. Подтверждением наличия PGC послужил достоверно ( $p \leq 0.05$ ) высокий уровень экспрессии специфических генов -маркеров PGC CXCR4 (хемокинового рецептора CXС типа 4) и PIWIL1 (Piwi-подобного белка 1) в культуре выращиваемых клеток. Полученные результаты послужат полезной информацией для культивирования PGC, что активно используются для разных научно-практических целей таких как модели развития зародышевой линии, для получения трансгенных птиц, использования культуральных PGC для сохранения генетических ресурсов диких и домашних птиц.

**Ключевые слова:** курица, примордиальные половые клетки, культивирование, экспрессия генов

**DOI:** 10.56304/S0234275822020065

Примордиальные зародышевые клетки (PGC) являются предшественниками яйцеклеток и сперматозоидов [1]. PGC хорошо подходят для культивирования и генетической модификации *in vitro* и служат эффективным инструментом как для криоконсервации генетических ресурсов птиц, так и для производства трансгенных кур в том числе и с помощью технологии CRISPR/Cas9. Сразу после становления кровообращения в эмбрионе кур они временно циркулируют в дорсальной аорте зародыша. Это предпочтительное время для их выделения из крови эмбриона, так как на 7–8 сутки инкубации для дальнейшего развития клетки мигрируют в гонады [2].

Поскольку PGC представляют собой очень маленькую популяцию клеток на раннем этапе развития и составляют менее 0,02% всех клеток крови и примерно 2% клеток гонад [3], перенос интактной крови или клеток гонад к эмбрионам-реципиентам приводит к очень низкой эффективности производства химерных цыплят [4].

Целью данной работы являлся подбор культуральных сред для поддержания жизнедеятельности и увеличения количества PGC, разработка метода их выделения и очистки.

### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Для проведения работ были отобраны яйца ( $n = 81$ ) кур пушкинской породы яично-мясного типа продуктивности биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ [5]. PGC кур отбирали на 3–4 сутки инкубации из дорсальной аорты эмбрионов (стадия Hamburger-Hamilton 14). Яйца инкубировали в лабораторном инкубаторе (ИФХ-250НС, Россия) с периодической сменой положения при 37–38°C и относительной влажности 65–70%. Масса яиц для получения PGC при закладке на инкубацию составляла от 55 до 62 г. Инкубационное яйцо вскрывали помощью дремели (Budget, Германия), в скорлупе выпиливали отверстие диаметром 10–15 мм.



**Рис. 1.** Отбор PGC в дорсальной аорте эмбриона на 3 сутки инкубации.  
**Fig. 1.** Selection of PGC in the portal aorta of the embryo on the 3rd day of incubation.

Через полученное отверстие под бинокляром отбор клеток осуществляли с помощью микроинъектора (Narishige IM-11-2, Japan; диаметр иглы 30 мкм) (рис. 1). Клетки культивировали 21 день при 37°C с 4% CO<sub>2</sub> в инкубаторе HF-90 (Китай) в базовых средах (Gibco, Thermo Fisher, США) с добавками.

*В эксперименте использовали четыре варианта культуральных сред:*

**К** – базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement) без добавок;

**А** – среда **К** с добавлением различных компонентов;

**Б** – среда **А**, дополнительно содержащая антибиотик-антимикотик (Thermo Fisher) до 1X;

**В** – базовая среда KnockOut DMEM/F-12 (Gibco, Thermo Fisher), дополнительно содержащая Human Activin A Recombinant Protein (Gibco, Thermo Fisher) и Human FGF-basic Recombinant Protein (Gibco, Thermo Fisher) (табл. 3).

Каждые 2 дня проводили замену 1/2 объема культуральной среды. При культивировании PGC клеток использовали планшеты Nunc Cell-Culture Treated Multidishes (Thermo Fisher) с гидрофильной

поверхностью. Контроль пролиферации и жизнедеятельности клеток осуществляли визуально на инвертированном микроскопе Olympus AHMT (Япония) с использованием программы TOP VIEW при увеличении ×400. Отношение живых и мертвых клеток оценивали при помощи красителя трипановый синий (0.5%) по стандартной методике. Подсчет клеток проводили на автоматическом счетчике клеток TC20 (Bio-Rad, США).

Для идентификации PGC в культуре клеток, проведен анализ экспрессии специфических примордиальных генов в реальном времени в следующей последовательности: клетки в количестве  $2.3 \times 10^6 \pm 0.06 \times 10^6$  культивировали в среде **В**, промывали 0.1 М фосфатным буфером pH 7.0, лизировали реагентом ExtractRNA (“Евроген”, Россия) согласно инструкции производителя и замораживали при –20°C. Синтез первой цепи кДНК с одноцепочечной матрицы РНК проводили с помощью обратной транскриптазы MINT (“Евроген”). Для инициации реакции использовали праймеры для специфических примордиальных генов (табл. 1). Анализ экспрессии генов выполняли с помощью программы Data analysis амплификатора CFX-96 (Bio-Rad, США). Референсным контролем служил ген домашнего хозяйства GAPDH [6],

**Таблица 1.** Праймеры, использованные в работе  
**Table 1.** Primers and probes used in this work

Ген	Праймеры
CXCR4	F: AAGAGGAGGTCAGCCACAGA RV: TTTCAACCGGATCTTCTTGC
PIWIL1	F: CACACGGCGCAACTATGATG RV: CTTTGAACAACGCAGCGTGA
GAPDH	F: CCTCTCTGGCAAAGTCCAAG RV: CATCTGCCCATTTGATGTTG

**Таблица 2.** Выход эмбрионов кур пушкинской породы от яиц с различной массой ( $n = 100$ )

**Table 2.** Yield of Pushkin chicken embryos from eggs with different weights ( $n = 100$ )

Масса яиц, г	55.0–59.9	60.0–62.9	63.0–65.0
Выход эмбрионов (%)	60 <sup>a</sup>	35 <sup>b</sup>	5 <sup>c</sup>

*Примечание.* Достоверность различия сравниваемых значений ( $t$ -критерий Стьюдента)  $a : b, a : c, b : c$ , при  $p \leq 0.05$ .

*Note.* Significance of the difference between the compared values (Student's  $t$ -test)  $a : b, a : c, b : c$ , at  $p \leq 0.05$ .

для внешнего контроля экспрессии генов брали ткани тонкого кишечника взрослой курицы.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выявлено, что эмбрионы, полученные из крупных яиц от 63 г и более, плохо развиваются или вообще не доходят до стадии отбора PGC (табл. 2).

Оптимальное время отбора PGC кур на 3–4 сутки инкубации из дорсальной аорты эмбрионов (стадия Hamburger-Hamilton 14) [7–9]. Взятие клеток на более ранних или более поздних стадиях вызывает комплекс осложнений. На более ранних, аорта слишком тонкая, и отбор затруднен, а на более поздних стадиях количество PGC клеток резко уменьшается в аорте из-за их миграции дальше по кровеносному руслу в зачатки гонад. В первые дни культивирования в среде кроме PGC клеток, много форменных элементов крови, и клетки трудно идентифицировать. К 21 дню культивирования клетки крови деградируют, остаются только PGC.

PGC курицы, выделенные из эмбриональной крови, могут быть пролиферированы в течение

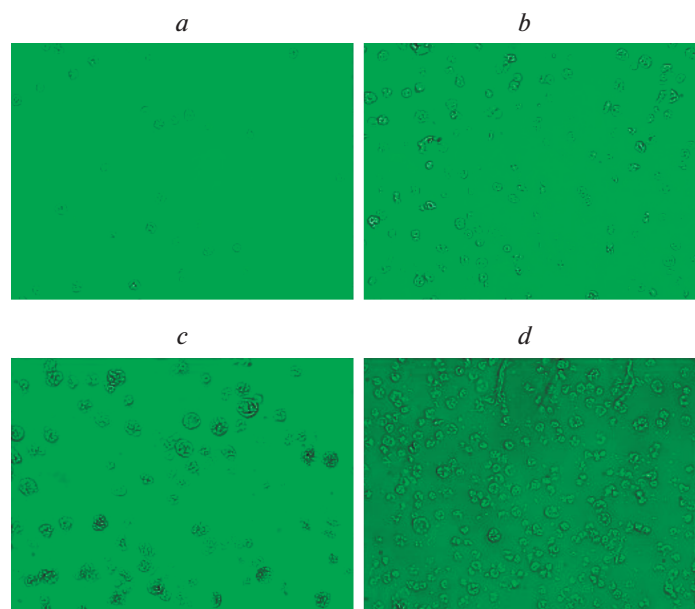
**Таблица 3.** Количество живых PGC в различных системах культивирования (время культивирования – 21 день, число экспериментов – 3)

**Table 3.** Number of PGCs in different culture systems (culture time – 21 days, number of experiments – 3)

Обозначение	Базовая среда	Дополнительные компоненты среды (расчет на 500 мл среды)	Количество живых PGC (средние значения $\pm$ стандартная ошибка)
К	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement)	–	$0.36 \times 10^6 \pm 0.01 \times 10^6$ <sup>k</sup>
А	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement)	Натрия пируват 1М, нуклеозиды Embryo Max Nucleosides 100X – 2.5 мл, Chicken Serum – 2%, 2-меркаптоэтанол – 3.9 мкл	$0.34 \times 10^6 \pm 0.04 \times 10^6$ <sup>a</sup>
Б	Базовая среда Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement)	Натрия пируват 1М, нуклеозиды Embryo Max Nucleosides 100X – 2.5 мл, Chicken Serum – 20%, 2-меркаптоэтанол – 3.9 мкл, антибиотик-антимикотик до 1X	$0.47 \times 10^6 \pm 0.07 \times 10^6$ <sup>b</sup>
В	Базовая среда KnockOut DMEM/F-12, без L-глутамина	Натрия пируват 1М, нуклеозиды Embryo Max Nucleosides 100X – 2.5 мл, Chicken Serum – 2%, 2-меркаптоэтанол – 3.9 мкл, антибиотик-антимикотик до 1X Human Activin A Recombinant Protein – 25 нг/мкл, Human FGF-basic (FGF-2/bFGF) Recombinant Protein – 10 нг/мкл,	$0.84 \times 10^6 \pm 0.06 \times 10^6$ <sup>c</sup>

*Примечание.* Концентрация клеток в расчете на 1 млн/мл среды. Достоверность различия сравниваемых значений ( $t$ -критерий Стьюдента)  $k : a, k : b, k : c, a : b, a : c, b : c$ , при  $p \leq 0.05$ .

*Note.* Cell concentration per 1 million/ml medium. Significance of the difference between the compared values (Student's  $t$ -test)  $k : a, k : b, k : c, a : b, a : c, b : c$ , at  $p \leq 0.05$ .



**Рис. 2.** Пролiferация и жизнеспособность PGC клеток в разных средах. *a* – среда К, *b* – среда А, *c* – среда Б, *d* – среда В.  
**Fig. 2.** Proliferation and viability of PGC cells in different media. *a* – base medium K, *b* – base medium A, *c* – base medium B, *d* – base medium V.

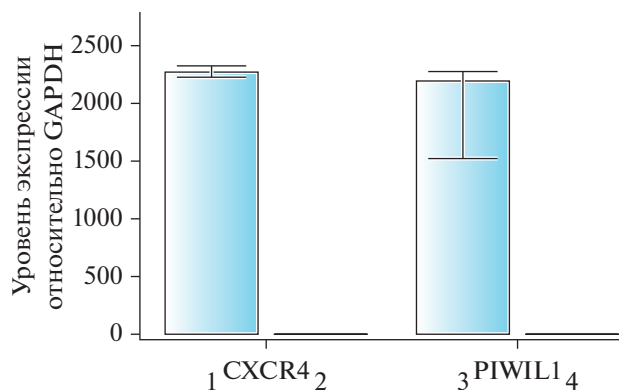
длительного времени в комплексных культуральных средах, содержащих куриную сыворотку, фетальную бычью сыворотку (FBS), фактор роста фибробластов 2 (FGF2) и среду, кондиционированную клетками печени буйвола (BRL), сохраняя при этом специфичность клонов и способность к передаче зародышевой линии [10]. Whyte с соавторами установили, что FGF2, инсулин и активин необходимы для пролиферации куриных PGC [11], что позволяет эффективно выращивать и размножать PGC как самцов, так и самок кур.

При использовании базовой среды в качестве контроля (рис. 2*a*) без дополнительных добавок количество живых PGC составило 28%. При культивировании в среде А без антибиотика-антимикотика была незначительная пролиферация, и часть лунок с клетками зарастала. На 21 день количество живых клеток в культуре достигало 26% (рис. 2*b*). Среда Б, содержащая антибиотик-антимикотик, была меньше подвержена зарастанию, однако интенсивного роста и пролиферации клеток не наблюдалось, количество живых клеток составляло 32% (рис. 2*c*). Среда В с добавлением Activin A и FGF-2/bFGF оказалась наиболее эффективной для культивирования клеток, зарастания практически не наблюдалось, клетки активно пролиферировались. Количество живых PGC составило 38% (рис. 2*d*), то есть в среде В их в 2.3 раза больше, чем в среде К. Готовые к трансформации PGC по морфологическим характеристикам имели неровную шарообразную форму и внутри клеток присутствовали цитоплазматические липиды, которые придавали клеткам гранулезную структуру. Таким

образом, из четырех исследованных вариантов сред для культивирования наиболее эффективной оказалась среда В, обеспечивающая высокий рост и пролиферацию клеток кур породы пушкинская из биоресурсной коллекции ВНИИГРЖ (табл. 3).

Подтверждением наличия PGC послужил достоверно ( $p \leq 0.05$ ) высокий уровень экспрессии специфических генов-маркеров PGC CXCR4 (хемокинового рецептора CXС типа 4) и PIWIL1 (Piwi-подобного белка 1) в культуре выращиваемых клеток [12]. В контрольном образце ткани тонкого кишечника взрослой курицы (возраст 330 дней) полностью отсутствовала экспрессия вышеуказанных генов (рис. 3).

Таким образом, при проведении экспериментов выявлено критическое значение размера яйца для дальнейшего отбора PGC. Бессывороточная базовая среда KnockOut DMEM/F-12 с добавлением факторов роста Activin A и FGF-2/bFGF, обеспечила значительно больший рост числа живых PGC по сравнению с дорогостоящей сывороточной базовой средой Opti-MEM, содержащей антибиотик-антимикотик. Полученные результаты создают фундаментальную основу для сохранения генетических ресурсов диких и домашних птиц, а также предоставляют возможность внесения генетических модификаций в PGC, что позволит проводить ускоренное совершенствование продуктивных качеств всех видов сельскохозяйственных птиц.



**Рис. 3.** Экспрессия маркеров PGC во время культивирования в среде В (*in vitro* – 21 день, достоверность различия сравниваемых значений  $p \leq 0.05$ ). CXCR4 ген: 1 – культура клеток PGC, 2 – ткань тонкого кишечника Gallus gallus. PIWIL1 ген: 3 – культура клеток PGC, 4 – ткань тонкого кишечника Gallus gallus.

**Fig. 3.** Expression of PGC markers during *in vitro* culture (21 days, significance of the difference between the compared values  $p \leq 0.05$ ). CXCR4 gene: 1 – PGC cell culture, 2 – Tissue of the small intestine Gallus gallus. PIWIL1 gene: 3 – PGC cell culture, 4 – Tissue of the small intestine Gallus gallus.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 20-76-10006).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Macdonald J., Glover J.D., Taylor L., Sang H.M., Mc Grew M.J. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS One*, 2010, 5(11), e15518. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015518>
2. Nakamura Y., Kagami H., Tagami T. Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Development Growth Differ.*, 2013, 55, 20–40. <https://doi.org/10.1111/dgd.12026>
3. Mozdziaik P.E., Angerman-Stewart J., Rushton B. Pardue S.L., Petite J.N. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult. Sci.*, 2005, 84, 594–600. <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.594>
4. Yamamoto Y., Usui F., Nakamura Y., Ito Y., Tagami T., Nirasawa K., Matsubara Y., Ono T., Kagami H. A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of Germline chimeras in chicken. *Biol. Reprod.*, 2007, 77, 115–119. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.061200>
5. “Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур”. ЦКП Федерального государственного бюджетного научного учреждения “Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста”, [Электронный ресурс]. (Дата обращения: 11.01.2022). <https://vniigen.ru/ckp-geneticheskaya-kollekciya-redkix-i-ischeyushhix-porod-kur/>
6. Lazar B., Szabadi N.T., Anand M., Toth, R., Ecker A., Urban M., Aponte M.T.S., Stepanova G., Hegyi Z., Homolya L., Várkonyi E.P., Pain B., Góczy E. Effect of miR-302b MicroRNA Inhibition on Chicken Primordial Germ Cell Proliferation and Apoptosis Rate. *Genes*, 2022, 13, 82. <https://doi.org/10.3390/genes13010082>
7. Nakamura Y., Yamamoto Y., Usui F., Mushika T., Ono T., Setioko A.R., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., Tagami T. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult. Sci.*, 2007, 86(10), 2182–2193. <https://doi.org/10.1093/ps/86.10.2182>
8. Yamamoto Y., Usui F., Nakamura Y., Ito Y., Tagami T., Nirasawa K., Matsubara Y., Ono T., Kagami H. A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken. *Biol. Reprod.*, 2007, 77(1), 115–119. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.107.061200>
9. Jung K.M., Kim Y.M., Ono T., Han J.Y. Size-dependent isolation of primordial germ cells from avian species. *Mol. Reprod. Dev.*, 2017, 84(6), 508–516. <https://doi.org/10.1002/mrd.22802>
10. van de Lavoie M.C., Diamond J.H., Leighton P.A., Mather-Love C., Heyer B.S., Bradshaw R., Kerchner A., Hooi L.T., Gessaro T.M., Swanberg S.E., Delany M.E., Etches R.J. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 2006, 441, 766–769
11. Whyte J., Glover J.D., Woodcock M., Brzeszczynska J., Taylor L., Sherman A., Kaiser P., McGrew M.J. FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Rev.*, 2015, 5, 1171–1182
12. Chen Y.C., Lin S.P., Chang Y.Y., Chang W.P., Wei L.Y., Liu H.C., Huang J.F., Pain B., Wu S.C. In vitro culture and characterization of duck primordial germ cells. *Poult. Sci.*, 2019, 98(4), 1820–1832. <https://doi.org/10.3382/ps/pey515>

## Development of Technological Approaches to the Production and Cultivation of Primordial Germ Cells of Pushkin Chickens

T. A. Larkina<sup>a, #</sup>, A. A. Krutikova<sup>a</sup>, G. K. Peglivanyan<sup>a</sup>,  
E. A. Polteva<sup>a</sup>, Yu. S. Shcherbakov<sup>a</sup>, and O. Yu. Barkova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>All-Russian Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals (VNIIGRZh), Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, Pushkin, St. Petersburg, 196601 Russia

<sup>#</sup>e-mail: tanya.larkina2015@yandex.ru

**Abstract**—Primordial germ cells (PGC) are the precursors of eggs and spermatozoa and are convenient objects for cultivation and genetic modification in vitro. When developing technological approaches to the production and cultivation of PGC, four variants of culture media were tested. It was found that the serum-free base medium KnockOut DMEM/F-12 without L-glutamine, containing the growth factors Activin A and FGF-2/bFGF, was the most effective, providing high growth and proliferation of PGC cells in Pushkin chickens from the VNIIGRZh bioresource collection. The presence of PGC was confirmed by a significantly ( $p \leq 0.05$ ) high expression level of specific markers of PGC genes, CXCR4 (CXC chemokine receptor type 4) and PIWIL1 (Piwi-like protein 1), in a growing cell culture. The results obtained will provide useful information for the cultivation of PGCs, which are actively used for various scientific and practical purposes: as a model for germline development, for the production of transgenic birds, and the conservation of genetic resources of wild and domestic birds.

*Keywords:* chicken, primordial germ cells, cultivation, gene expression