

## ОСОБЕННОСТИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ И ДЕКРИОКОНСЕРВАЦИИ ПРИМОРДИАЛЬНЫХ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК ПУШКИНСКОЙ ПОРОДЫ КУР

© 2024 г. Г. К. Пегливанян<sup>1</sup>, \*, Т. А. Ларкина<sup>1</sup>, Н. Р. Рейбах<sup>1</sup>, Е. А. Полтева<sup>1</sup>, А. П. Дысин<sup>1</sup>,  
А. Е. Рябова<sup>1</sup>, А. И. Азовцева<sup>1</sup>, А. А. Крутикова<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”, Санкт-Петербург, г. Пушкин, 196601 Россия

\*e-mail: Peglivanian\_grig@mail.ru

Поступила в редакцию 02.09.2024 г.

После доработки 17.09.2024 г.

Принята к публикации 22.09.2024 г.

Проведена оптимизация протоколов криоконсервации и последующего размораживания первичных половых клеток кур пушкинской породы. Выявлено что при контролируемой скорости охлаждения 1°C/мин и комбинации проникающих и непроникающих криопротекторов, после медленного оттаивания клеток при 37°C их максимальная жизнеспособность составила 62.9%, что значительно выше значений, наблюдаемых при размораживании при 4°C. Полученные результаты подчеркивают критическую роль температуры оттаивания в выживаемости клеток, демонстрируя, что быстрое оттаивание повышает их жизнеспособность, сводя к минимуму сублетальные повреждения. Проведенное исследование предлагает более совершенный подход к сохранению генетических ресурсов домашней птицы и создает потенциал для биотехнологии в области животноводства.

**Ключевые слова:** примордиальные половые клетки, PGCs, куры, криоконсервация, декриоконсервация, криопротекторы, биотехнология

**DOI:** 10.56304/S0234275824050090

### ВВЕДЕНИЕ.

Криоконсервированные половые клетки животных активно используются в практике сельского хозяйства. Для птиц методы криоконсервации половых клеток разработаны в основном только для сперматозоидов. Особенности строения и функционирования репродуктивной системы птиц существенно затрудняют процесс криоконсервации и использования яйцеклеток птиц. Решением этой проблемы стало использование получаемых из эмбрионов птиц примордиальных половых клеток (PGCs), являющихся предшественниками яйцеклеток и сперматозоидов [1, 2].

У некоторых классов животных, включая птиц, половые клетки закладываются на ранних стадиях эмбрионального развития в отдельной клеточной линии PGCs [3]. PGCs играют ключевую роль в биотехнологии, поскольку они предлагают уникальную платформу для генетических манипуляций и передачи зародышевой линии у различных видов животных [1].

Криоконсервация и декриоконсервация PGCs у различных видов домашних животных является ценным методом сохранения генетических ре-

сурсов редких пород и видов, которые находятся под угрозой исчезновения. PGCs можно подвергать криоконсервации различными методами, такими как медленное замораживание, витрификация или инкапсулирование-дегидратация, в зависимости от типа и концентрации криопротекторов, скорости охлаждения и разогрева, а также используемых контейнеров для хранения. Низкие температуры могут снижать метаболическую активность клетки и предотвращать их дифференцировку, тем самым сохраняя плюрипотентность и тотипотентность [4]. Также низкие температуры могут вызывать повреждения и холодовый шок клеток, что может повлиять на целостность их мембран, активность митохондрий и структуру цитоскелета [5]. Образование льда является основной причиной криоповреждений, поскольку оно может вызывать осмотический стресс и клеточную дегидратацию. Криопротекторы – это вещества, которые могут защитить PGCs от повреждений в процессе замораживания путем минимизации образования льда, стабилизации мембраны и цитоскелета, удаления свободных радикалов и модуляции экспрессии генов [6]. Криопротекторы можно разделить

на проникающие и не проникающие типы в зависимости от их способности диффундировать через клеточную мембрану. Соединения, такие как глицерин, диметилсульфоксид (ДМСО), этиленгликоль и пропиленгликоль, могут проникать в PGCs и уменьшать образование внутриклеточного льда. Непроницаемые криопротекторы, такие как сахара, полимеры и белки, могут оставаться во внеклеточной жидкости и уменьшать образование внеклеточного льда. Комбинация обоих типов криопротекторов часто используется для достижения оптимальной защиты PGCs. Выбор и концентрация криопротекторных агентов имеют решающее значение для успешного криосохранения куриных PGCs, поскольку криопротекторы могут влиять на восстановление, выживание и зародышевую компетентность клеток после размораживания. Обычно используемыми криозащитными агентами для куриных PGCs являются ДМСО и пропиленгликоль (PG) [7].

Размораживание — это процесс восстановления жизнеспособности и функциональности PGCs после криоконсервации. Основным принципом размораживания PGCs является эффект скорости прогрева в процессе оттаивания. Скорость нагревания влияет на выживаемость и функциональность PGCs после криоконсервации, а также на степень клеточной регидратации и осмотического стресса и время воздействия криопротекторов [8].

В связи с этим существует необходимость в оптимизации методов криоконсервации PGCs кур с учетом специфики этих клеток. Выбор эффективного метода должен основываться на оценке множества критериев, таких как жизнеспособность клеток, функциональность, компетентность зародышевой линии, генетическая стабильность, безопасность, экономическая эффективность и практичность.

Цель данной работы: оптимизация методологии криоконсервации и последующего размораживания PGCs кур пушкинской породы.

## УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Исследования проводили на базе лаборатории молекулярной генетики Всероссийского научно-исследовательского института генетики и разведения сельскохозяйственных животных (ВНИИГРЖ). Объект исследования — примордиальные половые клетки пушкинской породы кур из биоресурсной коллекции “Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур” (ВНИИГРЖ, Санкт-Петербург).

Для определения переносимости процедуры криоконсервации и декриоконсервации уровня выживаемости клеток и их пролиферации проводили подсчет по формуле ( $N = kn \times 10^4$ ), где  $N$  — количество клеток в 1 мл,  $n$  — количество клеток,

посчитанных в 25 больших квадратах камеры Горяева,  $k$  — коэффициент разведения.

Заморозку и разморозку проводили в ламинарном боксе (БМБ-II-“Ламинар-С”-1,2, Россия), одновременно работая с одной клеточной культурой.

В работе использовали следующее оборудование и расходные материалы: центрифуга лабораторная (Eppendorf, Германия), пипетки, планшет культуральный Nunc Cell-Culture Treated Multidishes с гидрофильной поверхностью (Thermo Fisher Scientific, США), инкубатор CO<sub>2</sub> HF-90 (Heal Force, Китай), холодильник лабораторный (Pozis, Россия), водяная баня +4°C, твердотельный термостат “Термит” (“ДНК-Технология”, Россия), инвертированный световой микроскоп LEICA DM18 (Nicon, Германия), микроскоп биологический Микромед 2 (3–20 inf.) (“Микромед”, Россия), камера Горяева, контейнер для криозаморозки (AZENTA, США), криопробирки (Биолайн, Россия), пробирки типа “Эппендорф” объемом 0.5, 5, 1.5 мл стерильные типы (“Корнинг Инкорпорейтед”, США), приготовленная нами ростовая среда, состоящая из следующих компонентов: (Opti-MEM (Reduced Serum Medium, GlutaMAX Supplement, Gibco, Thermo Fisher Scientific), натрия пируват — 50 мкл, (Россия), нуклеозиды Embryo Max Nucleosides — 250 мкл (Великобритания), Chicken Serum — 1 мл, (Gibco, Thermo Fisher, Scientific), 2-меркаптоэтанол — 0.4 мкл, (Россия), антибиотик-антимикотик — 500 мкл, (Thermo Fisher Scientific), Human Activin A Recombinant Protein — 1 мкл (Gibco, Thermo Fisher, Scientific), Human FGF-basic (FGF-2/bFGF) Recombinant Protein — 5 мкл (Gibco, Thermo Fisher Scientific), раствор трипанового синего 0.4% (“Биолот”, Россия), диметилсульфоксид (ДМСО, “Биолот”), жидкий азот.

Клетки, растущие на поверхности культурального пластика, переводили в суспензионное состояние переносом планшета и его выдерживанием при комнатной температуре для инактивации адгезивного слоя. Затем суспензию клеток из каждой лунки планшета переносили в пробирки объемом 1.5 мл.

Для определения итогового количества клеток и оценки их жизнеспособности в пробирки объемом 0.5 мл отбирали 10 мкл суспензии. Анализируемую суспензию клеток предварительно окрашивали 0.4% трипановым синим, добавляя 2.5 мкл на 10 мкл культуры клеток и инкубировали в течение 1 мин при комнатной температуре для выявления мертвых клеток. Подсчет клеток проводили в счетной камере Горяева по стандартной методике с помощью микроскопа Микромед 2 (3–20 inf). Число живых и мертвых клеток подсчитывали в 25 больших квадратах микросетки.

В эксперименте был применен метод криоконсервации с понижением температуры на 1°C в

**Таблица 1.** Количественные показатели культур PGCs кур до и после криоконсервации  
**Table 1.** Quantification of chicken PGCs cultures before and after cryopreservation

№ образца	21 день, перед замораживанием		После разморозки +4°C		21 день, перед замораживанием		После разморозки +37°C	
	всево клеток, млн/мл	живые клетки, млн/мл	живые клетки после разморозки млн/мл	выживаемость, %	всево 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
<i>M ± m</i>	1.73 ± 0.04	1.53 ± 0.07	0.70 ± 0.03 <sup>a</sup>	46.2 ± 3.00	2.10 ± 0.14	1.81 ± 0.11	1.00 ± 0.04 <sup>b</sup>	55.6 ± 3.30

*Примечание:* В расчетах использовали *t*-критерий Стьюдента при сравнении средних значений с ошибкой между двумя группами (Живые клетки после разморозки при +4°C (0.70 ± 0.03<sup>a</sup>) и (Живые клетки после разморозки при +37°C (1.00 ± 0.04<sup>b</sup>)). *P* ≤ 0.01.  
*Note.* A Student's *t*-test was employed in the calculations comparing the mean values with an error between the two groups (live cells after thawing at +4 °C (0.70 ± 0.03<sup>a</sup>)) and (live cells after thawing at +37°C (1.00 ± 0.04<sup>b</sup>)). *P* ≤ 0.01.

мин с использованием специализированного криоконтейнера для заморозки (AZENTA).

Для предотвращения осмотического и температурного шока готовили два равных по объемному соотношению раствора: 1 – суспензия клеток в ростовой среде и 2 – ростовая среда с удвоенной концентрацией криопротектора. Для приготовления этого раствора в пробирку объемом 5 мл вносили по 200 мкл ростовой среды на каждую замораживаемую пробу и по 50 мкл ДМСО, затем по каплям при постоянном перемешивании вносили криопротектор. Далее 250 мкл полученного раствора медленно по каплям добавляли к суспензии клеток. Полученную суспензию переносили в криопробирки, которые герметично закрывали и маркировали (указывая породу птицы, дату криоконсервации и номер пробы). Пробирки помещали в контейнер (AZENTA) для криозаморозки и убирали в холодильную камеру на –80°C. Через 4 ч переносили пробирки на хранение в жидкий азот (–196°C).

Криопробирки с замороженной суспензией клеток доставали пинцетом из жидкого азота, выдерживали при комнатной температуре до прекращения парения и размораживали на водяной бане при +4 или +37°C. Дезинфицировали поверхность криопробирок 70%-ным этанолом и заносили в ламинарный бокс для последующей работы. Содержимое в криопробирках переносили в стерильные пробирки объемом 1.5 мл. Центрифугировали 4 мин при 190 g. Аккуратно удаляли надосадочную жидкость, затем вносили в пробирки по 300 мкл подогретой до 37°C ростовой среды, суспензировали и высевали суспензию в лунки планшета. Помещали в CO<sub>2</sub>-инкубатор (37°C и 4% CO<sub>2</sub>,

влажность 80–90%). Культивировали 3–5 дней. Затем проводили оценку выживаемости.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Степень выживаемости примордиальных половых клеток кур определяли после криоконсервации при разморозке методом постепенного повышения температуры на водяной бане в двух температурных режимах: +4 и +37°C. Максимальный процент выживаемости после разморозки PGCs при +37°C составил 62.9%, а минимальный – 45.5%. В то время как при разморозке на водяной бане при +4°C максимальный процент выживаемости PGCs составил 52.2%, а минимальный – 34.8% (табл. 1).

Таким образом, при разморозке при +4 и при +37°C, выживаемость клеток различалась, достоверность различия между средним по группе по показателю “живые клетки после разморозки” составила *P* ≤ 0.01.

Наблюдаемый максимальный уровень выживаемости в 62.9% при +37°C согласуется с данными об устойчивости куриных PGCs в процессе криоконсервации [9]. Показатели выживаемости после криоконсервации, включающие снижение температуры на 1°C в мин с использованием специализированного криоконтейнера представленные в настоящем исследовании, находятся в диапазоне ранее зарегистрированных значений для PGCs птиц, которые были получены в процессе криоконсервации в исследованиях других авторов [10].

После размораживания содержимое криопробирок переносили в стерильные пробирки объемом 1.5 мл, центрифугировали 4 мин при 190 g и

**Таблица 2.** Количество PGCs до и после криоконсервации  
**Table 2.** Quantification of PGCs before and after cryopreservation

№ Образца	Разморозка при +4°C			Разморозка при +37°C		
	всего клеток, до замораживания млн/мл	количество клеток, после отмывки от криопротектора		всего клеток, до замораживания 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
<i>M ± m</i>	1.73 ± 0.04	0.90 ± 0.03	51.9 ± 2.34 <sup>a</sup>	2.10 ± 0.14	1.42 ± 0.08	68.1 ± 3.79 <sup>b</sup>

*Примечание:* В расчетах использовали *t*-критерий Стьюдента при сравнении средних значений с ошибкой между двумя группами (Количество клеток, после отмывки от криопротектора, в % при +4°C (51.9 ± 2.34<sup>a</sup>) и (Количество клеток, после отмывки от криопротектора при +37°C (68.1 ± 0.79<sup>b</sup>). *P* ≤ 0.01.

*Note:* A Student's *t*-test was employed in the calculations for the comparison of mean values with an error between two groups. The groups were as follows: <sup>(a)</sup> Number of cells, after washing from cryoprotectant, in % at +4°C (51.9 ± 2.34) and <sup>(b)</sup> Number of cells, after washing from cryoprotectant at +37°C (68.1 ± 0.79). The level of significance was set at *P* ≤ 0.01.

**Таблица 3.** Количественные показатели культур PGCs кур после криоконсервации  
**Table 3.** Quantification of chicken PGCs cultures after cryopreservation

№ Образца	Разморозка при +4°C			Разморозка при +37°C		
	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
<i>M ± m</i>	0.90 ± 0.0 <sup>a</sup>	0.70 ± 0.03 <sup>c</sup>	78.2 ± 3.69	1.42 ± 0.08 <sup>b</sup>	1.00 ± 0.04 <sup>d</sup>	71.3 ± 4.08

*Примечание:* В расчетах использовали *t*-критерий Стьюдента при сравнении средних значений с ошибкой между двумя группами (Всего клеток после разморозки при +4°C (0.90 ± 0.0<sup>a</sup>) и (Всего клеток после разморозки при +37°C (1.42 ± 0.08<sup>b</sup>)), или (Выживаемость после разморозки при +4°C (0.70 ± 0.03<sup>c</sup>) и (Выживаемость после разморозки при +37°C (1.00 ± 0.04<sup>d</sup>)). *P* ≤ 0.01.

*Note:* A Student's *t*-test was employed in the calculations for the comparison of mean values with an associated error between the two groups (total cells after thawing at +4°C (0.90 ± 0.0<sup>a</sup>) and (total cells after thawing at +37°C (1.42 ± 0.08<sup>b</sup>)), or (survival rate after thawing at +4°C (0.70 ± 0.03<sup>c</sup>) and (survival rate after thawing at +37°C (1.00 ± 0.04<sup>d</sup>)). *P* ≤ 0.01.

удаляли супернатант, содержащий криопротектор. При этой процедуре отмывки наблюдались потери клеток по отношению к количеству замороженных клеток (табл. 2).

В ходе размораживания и отмывки от криопротектора минимальное количество сохранившихся клеток при +4°C составило 45.0%, а максимальное 57.0%, а при +37°C min 56.0%, а max 78.9%. После разморозки при +4°C в среднем осталось 51.9% клеток и 68.1% при +37°C. Достоверность полученных значений составила *P* ≤ 0.01.

Анализ данных табл. 3, позволяет предположить, что быстрое размораживание криоконсервированных PGCs при +37°C способствует высокому уровню выживаемости клеток (71.3 ± 4.08%), однако проведение процесса при этой температуре

может вызывать сублетальные повреждения клеток, влияющие на их жизнеспособность. Размораживание криоконсервированных PGCs при +4°C оказалось более щадящим, выживаемость PGCs при нем составила 78.2 ± 3.69%. Результаты настоящего исследования подчеркивают важность условий оттаивания для жизнеспособности PGCs. Однако для выяснения основных механизмов и соответствующей оптимизации протоколов оттаивания, требуется дальнейшее изучение. То, что метод оттаивания влияет на выживаемость клеток, подтверждается и в литературном обзоре Sun с соавторами, которые сообщили, что криоконсервированные клетки сохраняют свою первоначальную морфологию несмотря на различные способы оттаивания [11]. В исследовании Higaki et al.

максимальная выживаемость PGCs после разморозки при использовании этиленгликоля и ДМСО, оценивается примерно в 40 и 20%, соответственно [12], что несколько ниже полученных нами значений.

В исследованиях зарубежных авторов сообщалось о значительно более высоких показателях выживаемости PGCs после размораживания, достигавших  $89.4 \pm 0.2\%$  при использовании 10%-ного этиленгликоля в качестве криоконсерванта [13, 14].

Kim с соавторами отметили, что жизнеспособность PGCs после оттаивания не имела существенных различий между кроссами Иза Браун и коммерческой породой, и в обоих случаях выживаемость превышала 87%. В отличие от них, корейская порода Оге и Белый Леггорн продемонстрировали более низкие показатели жизнеспособности –  $77.6 \pm 1.1\%$  и  $76.2 \pm 0.9\%$ , соответственно [15]. Такая породная специфичность реакции на криоконсервацию позволяет предположить наличие потенциального генетического компонента, влияющего на устойчивость PGCs к процессам замораживания и оттаивания.

Таким образом, результаты проведенного исследования подчеркивают важность оптимизации протоколов криоконсервации и размораживания первичных половых клеток кур пушкинской породы. Условия оттаивания имеют критическое значение в сохранении, целостности и функциональности PGC. Результаты создают новую основу для совершенствования методов криоконсервации, прокладывая путь к эффективному сохранению генетических ресурсов домашней птицы и внося вклад в более широкую область биотехнологии животных. Будущие исследования должны изучить основные механизмы клеточного ответа на криоконсервацию для дальнейшего совершенствования этих протоколов.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

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

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ezaki R., Hirose F., Furusawa S., Horiuchi H. An improved protocol for stable and efficient culturing of chicken primordial germ cells using small-molecule inhibitors. *Cytotechnology*, 2020, 72, 397–405. <https://doi.org/10.1007/s10616-020-00385-9>
2. Mathan Zaib G., Jin K., Zuo Q., Habib M., Zhang Y., Li B. Formation, Application, and Significance of Chicken Primordial Germ Cells: A Review. *Animals*, 2023, 13(6), 1096. <https://doi.org/10.3390/ani13061096>
3. Chazaud C., Yamanaka Y., Pawson T., Rossant J. Early Lineage Segregation between Epiblast and Primitive Endoderm in Mouse Blastocysts through the Grb2-MAPK Pathway. *Dev. Cell*, 2006, 10(5), 615–624. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2006.02.020>
4. Ballantyne M., Taylor L., Hu T., Meunier D., Nandi S., Sherman A., McGrew M.J. Avian primordial germ cells are bipotent for male or female gametogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021, 9, 726827. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.726827>
5. Hu T., Taylor L., Sherman A., Tiambo C.K., Kemp S.J., Whitelaw B., McGrew M.J. A low-tech, cost-effective and efficient method for safeguarding genetic diversity by direct cryopreservation of poultry embryonic reproductive cells. *Elife*, 2022, 11, e74036. <https://doi.org/10.7554/eLife.74036>
6. Du Z., Zhang Q., Hong J., Xu X., Pang B., Li J., Wang X. Seasonal Freezing-Thawing Cycles Promote Livestock Excreta Decomposition and Soil Nutrient Transformation and Migration in an Alpine Steppe of Northern Tibetan Plateau, China. *China* (September 2, 2022). 2022. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4207474>
7. Canadell J.G., Monteiro P.M., Costa M.H., Cotrim da Cunha L., Cox P.M., Eliseev A.V., Zickfeld K. Global carbon and other biogeochemical cycles and feedbacks. *Climate change 2021: The physical science basis*. [https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/downloads/report/IPCC\\_AR6\\_WGI\\_Chapter05.pdf](https://www.ipcc.ch/report/ar6/wg1/downloads/report/IPCC_AR6_WGI_Chapter05.pdf).
8. Nakamura Y. Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells. *J. Reprod. Develop.*, 2016, 62(5), 431–437. <https://doi.org/10.1262/jrd.2016-052>
9. Ibrahim M., Grochowska E., Lázár B., Várkonyi E., Bednarczyk M., Stadnicka K. The Effect of Short-and Long-Term Cryopreservation on Chicken Primordial Germ Cells. *Genes*, 2024, 15(5), 624. <https://doi.org/10.3390/genes15050624>
10. Mathan., Zaib G., Jin K., Zuo Q., Habib M., Zhang Y., Li B. Formation, Application, and Significance of Chicken Primordial Germ Cells: A Review. *Animals*, 2023, 13(6), 1096. <https://doi.org/10.3390/ani13061096>
11. Sun Y., Li Y., Zong Y., Mehaisen G.M., Chen J. Poultry genetic heritage cryopreservation and reconstruction: Advancement and future challenges. *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, 2022, 13(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00768-2>
12. Higaki S., Mochizuki K., Baba H., Akashi Y., Yamaha E., Katagiri S., Takahashi Y. Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. *Jpn. J. Vet. Res.*, 2009, 57(2), 119–128.
13. Baust J.M., Campbell L.H., Harbell J.W. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In Vitro Cell. Devel. Biol.-Anim.*, 2017, 53, 855–871. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0201-y>
14. Kim H., Cho Y.M., Han J.Y., Choi S.B., Cho C.Y., Suh S., Kim S.W. Effect of Simple Freezing Method on Viability of Frozen-thawed Primordial Germ Cells on the Chicken. *Korean J. Poul. Sci.*, 2014, 41(4), 261–270. <https://doi.org/10.5536/kjps.2014.41.4.261>
15. Kim H., Kim D.H., Han J.Y., Choi S.B., Ko Y.G., Do Y.J., Kim S.W. Comparative study on the viability of frozen-thawed primordial germ cells using vitrification in chicken breed. *Korean J. Poult. Sci.*, 2013, 40(3), 207–216. <https://doi.org/10.5536/kjps.2013.40.3.207>

## Cryopreservation and Decryopreservation Peculiarities of Primordial Germ Cells of the Pushkin Breed of Chickens

G. K. Peglivanyan<sup>a, #</sup>, T. A. Larkina<sup>a</sup>, N. R. Reinbach<sup>a</sup>, E. A. Polteva<sup>a</sup>, A. P. Dysin<sup>a</sup>,  
A. E. Ryabova<sup>a</sup>, A. I. Azovtseva<sup>a</sup>, and A. A. Krutikova<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding – Branch of the L.K. Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, St. Petersburg, Pushkin, 196601 Russia*

<sup>#</sup>*e-mail: Peglivanian\_grig@mail.ru*

**Abstract**—The protocols for cryopreservation and subsequent thawing of primary germ cells of Pushkin hens were optimised. It was determined that a controlled cooling rate of 1°C/min and a combination of penetrating and non-penetrating cryoprotectants resulted in a maximum viability of 62.9% for the cells after slow thawing at 37°C. This value is significantly higher than the observed maximum viability during thawing at 4°C. The results emphasise the essential role of thawing temperature in cell survival, indicating that rapid thawing enhances cell viability by reducing sublethal damage. This study presents a more effective approach to the preservation of poultry genetic resources and offers potential for biotechnology in livestock production.

**Keywords:** primordial germ cells, PGCs, chickens, cryopreservation, decryopreservation, cryoprotectants, biotechnology