УДК 636.52/.58:591.324:576.3/.7.086.83:591.04

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ПРИМОРДИАЛЬНЫХ ЗАРОДЫШЕВЫХ КЛЕТОК КУР*

Е.К. ТОМГОРОВА[1], Н.А. ВОЛКОВА[1], Л.А. ВОЛКОВА[1], В.И. ФИСИНИН[2], Н.А. ЗИНОВЬЕВА[1]

Оптимизированы условия выделения примордиальных зародышевых клеток кур (кросс Птичное) из 4-8-суточных эмбрионов. Установлено, что эффективным методом дезагрегации куриных эмбрионов с целью получения эмбриональных клеток служит ферментативная обработка 0,05 % трипсином. Максимальное количество примордиальных зародышевых клеток может быть выделено из 6-суточных эмбрионов с последующим разделением суспензии клеток по адгезии после 90 мин культивирования при использовании эмбриональных фибробластов кур в качестве фидерного слоя. При инкубации ПЗК на фидерном слое жизнеспособность клеток сохранялась более длительное время — от 5 до 7 сут в зависимости от типа клеток, используемых в качестве фидерного слоя (перевиваемая клеточная линия STO, свежеизолированные и культивируемых в течение нескольких пассажей эмбриональных фибробластов кур).

Ключевые слова: цыплята, эмбрионы, примордиальные зародышевые клетки, условия выделения.

Keywords: chicken, embryos, primordial germ cells, conditions for isolation.

Для получения трансгенной птицы используют ряд методов (1-7). Однако, несмотря на заметные успехи в области трансгенеза птицы, создание трансгенных кур в настоящее время все еще представляет определенную проблему. Особенности воспроизводства и развития кур (8) значительно снижают эффективность традиционного метода введения экзогенной ДНК в клетки животных — микроинъекции, что требует поиска альтернативных способов направленного переноса генов. К числу таких методических подходов, интенсивно развиваемых в последние годы, относится прием, связанный с использованием разных типов плюрипотентных стволовых клеток (в том числе примордиальных зародышевых клеток — предшественников дифференцированных половых клеток) в качестве клеток-мишеней для введения рекомбинантной ДНК (9). Генетическая трансформация примордиальных зародышевых клеток (ПЗК) с их последующей трансплантацией в эмбрионы кур in vivo рассматривается как перспективный метод целенаправленной генетической модификации гонад и создания трансгенной птицы.

В связи с этим представляется актуальным проведение исследований по выделению и характеристике примордиальных зародышевых клеток кур как мишеней для генно-инженерных манипуляций, что и послужило целью настоящей работы.

Методика. Эксперименты проводили на эмбрионах кросса Птичное. Материалом для получения ПЗК служили эмбрионы с 4-х по 8-е сут развития (инкубации). Для дезагрегации эмбрионов использовали два методических подхода: механическую диссоциацию клеток или ферментативную обработку ткани. Диссоциацию клеток эмбрионов проводили посредством пипетирования в первом случае в среде DMEM (ООО «Пан-Эко», Россия) в течение 5 мин, во втором — в растворе трипсина разной концентрации (0,05; 0,10; 0,15 и 0,25 %), предварительно прогретого до 37 °С, в течение 7-10 мин.

* Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, проект № 11.519.11.2024. В проведении исследований использовано оборудование ЦКП «Биоресурсы и биоинженерия сельскохозяйственных животных» ГНУ ВИЖ Россельхозакадемии.

Суспензии клеток, полученные при использовании механической или ферментативной обработки ткани, сравнивали под микроскопом («Nikon», Япония) при увеличении ×400 визуально по следующим показателям: число клеток в суспензии, число единичных клеток, число клеток, объединенных в группы, число живых и мертвых клеток. Для идентификации ПЗК проводили окрашивание на гликоген (ШИК-реакция) (10).

Адгезирующую способность ПЗК кур по отношению к другим типам эмбриональных клеток оценивали при краткосрочном культивировании (от 15 до 120 мин) в чашках Петри со средой DMEM. По окончании инкубации культуральную среду, в которой находились не прикрепившиеся к подложке клетки, осторожно переливали из чашек Петри в центрифужные пробирки, центрифугировали (200 g, 5 мин). Осадок ресуспендировали в среде DMEM (240 кл/мкл), 50 мкл суспензии наносили на предметное стекло, делали мазок, высушивали и окрашивали на гликоген (ШИК-реакция) для идентификации ПЗК. На основании полученных результатов рассчитывали процент окрашенных клеток (ПЗК) от общего числа исследованных.

Для поддержания ПЗК в культуре использовали среду DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) и сыворотки плода коровы (15 %) с добавлением глутамина (2 мМ), 2-меркаптоэтанола (10^{-6} мМ) и гентамицина (50 мкг/мл). Суспензию клеток, полученную из 6-суточного эмбриона, высевали в чашки Петри (d = 100 мм) и культивировали в течение 18-24 ч, после чего супернатант, содержащий преимущественно клетки крови, сливали, а клетки, адгезированные на поверхности чашки Петри, снимали 0,25 % раствором трипсина и пересевали. После 90 мин культивирования, необходимого для адгезии эмбриональных фибробластов, супернатант, содержащий ПЗК, переносили на новые чашки Петри с фидерным слоем и без него. Фидерный слой готовили из перевиваемых эмбриональных фибробластов мыши линии STO, а также свежеизолированных и культивируемых в течение нескольких пассажей эмбриональных фибробластов кур.

Жизнеспособность клеток контролировали по общепринятой методике окрашиванием 0,5 % раствором трипанового синего (11).

Статистическую обработку данных осуществляли с помощью стандартной компьютерной программы Microsoft Excel.

Результаты. Было изучено влияние трех факторов (способа дезагрегации эмбрионов, очистки ПЗК от других типов клеток и возраста эмбрионов, используемых для получения ПЗК) на эффективность выделения ПЗК из эмбрионов кур.

При механической диссоциации куриных эмбрионов полученная суспензия состояла из клеток, как отделенных друг от друга, так и объединенных в группы. В суспензии доля единичных клеток и клеточных агломератов достигала соответственно 69 и 31 %. При неполной дезагрегации ткани под воздействием механической обработки отмечалось минимальное снижение жизнеспособности клеток (доля мертвых клеток не превышала 1 %).

Использование ферментативной обработки эмбрионов позволило получить суспензию, состоящую преимущественно из отдельных клеток. Клеточных агрегатов практически не наблюдали. Единичные группы клеток (до 0,1 %) были выявлены только при использовании 0,05 и 0,10 % трипсина. Однако выход жизнеспособных клеток оказался ниже, чем при механической диссоциации. При использовании 0,05 % трипсина отмечали максимальную долю таких клеток в суспензии — 95 %, что незначительно ниже (на 4 %) аналогичных показателей при механической обработке тканей. Учитывая это, а также возможность получения суспензии, представленной практически на 100 % разобщенными клетками, для вы-

деления ПЗК в дальнейших исследованиях мы использовали раствор трипсина в указанной концентрации.

Цитологический анализ препаратов, полученных из куриных эмбрионов на 4-8-е сут инкубации, выявил изменение количества ПЗК в гонадах с возрастом. Так, если у 4-суточных эмбрионов число ПЗК в расчете на один эмбрион равнялось лишь 302±18 кл., то к 6-м сут оно возрастало до 4080±70 кл. Затем этот показатель резко снижался (к 7-м и 8-м сут инкубации — в 3,2 и 4,3 раза) и составил соответственно 1217±76 и 940±37 кл., что можно объяснить началом дифференцировки ПЗК в гонадах в указанный период эмбриогенеза и обусловленной ею частичной потерей их морфологических признаков (в частности, некоторые клетки не окрашивались в ШИК-реакции на гликоген).

При изоляции ПЗК из эмбрионов кур полученная популяция клеток, как правило, неоднородна из-за присутствия других клеточных типов, что требует проведения дополнительных манипуляций по увеличению доли ПЗК в культуре, в частности разделения клеток по адгезии.

Сравнение адгезирующей способности ПЗК кур и других типов эмбриональных клеток методом краткосрочного (15-120 мин) культивирования показало, что в первичной популяции клеток куриных эмбрионов содержание ПЗК в суспензии не превышало 5,0±0,1 % (рис. 1). Разделение по адгезии позволило повысить долю таких клеток в клеточной популяции. Высокая однородность клеточной популяции была достигнута при разделении клеток после 90 мин культивирования: содержание ПЗК в суспензии достигало 80,7±3,4 %. При продолжительности менее 90 мин инкубация изолированных клеток в ростовой среде (с последующим разделением) позволила сформировать популяцию клеток, представленную ПЗК только на 26,5-67,9 %.

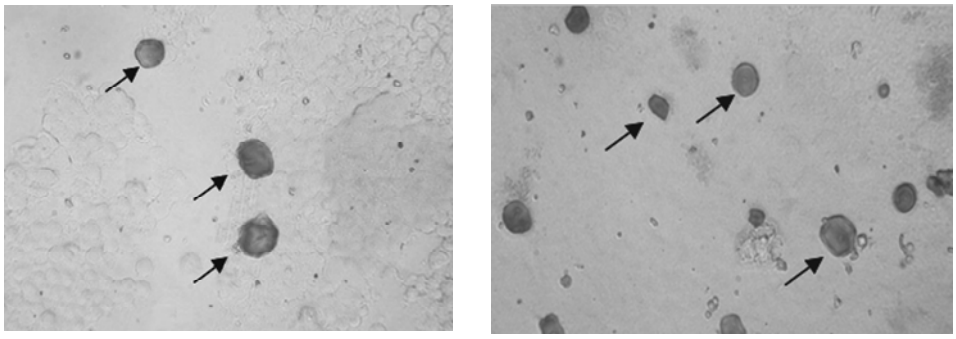

Рис. 1. Суспензия эмбриональных клеток кур (кросс Птичное), полученная до и после (соответственно слева и справа) **разделения клеток по адгезии** (примордиальные зародышевые клетки отмечены стрелками)**.** ШИК-окрашивание на гликоген, увеличение ×400.

Оптимизация условий выделения ПЗК из эмбрионов кур позволила получить популяцию клеток, состоящую в основном из ПЗК. Этот тип клеток по морфологическим характеристикам существенно отличался от других типов эмбриональных клеток: ПЗК имели шарообразную форму, их диаметр варьировал от 14 до 26 мкм.

Оценка эффективности поддержания ПЗК в культуре с использованием среды DMEM с добавками продемонстрировала, что в чашках Петри без фидерного слоя ПЗК сохраняли жизнеспособность на протяжении 1-2 сут. При этом они практически не прикреплялись к подложке и находились в суспензии во взвешенном состоянии. Окрашивание клеток 0,5 % раствором трипанового синего не выявило снижения их жизнеспособности в течение 8 ч культивирования. При увеличении срока инкубации доля жизнеспособных клеток снижалась и через 48 ч составила 0,1 % (рис. 2).

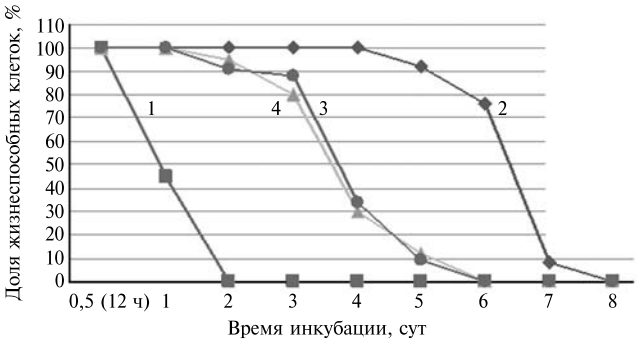

Рис. 2. Продолжительность культивирования примордиальных зародышевых клеток кур кросса Птичное в зависимости от типа клеток, используемых для получения фидерного слоя: 1 — без фидерного слоя, 2 — свежеизолированные эмбриональные куриные фибробласты, 3 — перевиваемые эмбриональные фибробласты мыши линии STO, 4 — культивируемые эмбриональные куриные фибробласты.

При инкубации ПЗК на фидерном слое жизнеспособность клеток сохранялась более длительное время. Продолжительность их культивирования варьировала от 5 до 7 сут в зависимости от типа клеток, используемых в качестве фидерного слоя — перевиваемой клеточной линии STO, свежеизолированных и культивируемых в течение нескольких пассажей эмбриональных фибробластов кур.

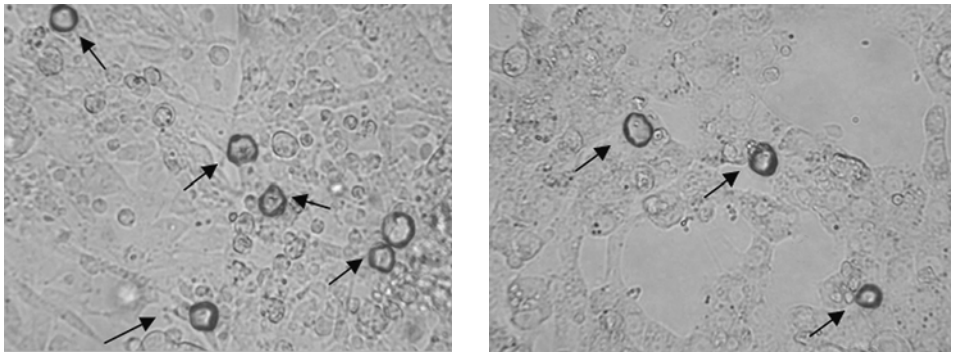

Рис. 3. Культивирование примордиальных зародышевых клеток кур (кросс Птичное) на разных фидерных слоях — эмбриональных фибробластах кур (слева) **и перевиваемых эмбриональных фибробластах мыши линии STO** (справа) (примордиальные зародышевые клетки отмечены стрелками)**.** Увеличение ×400.

Максимальная продолжительность культивирования ПЗК (7 сут) была установлена при использовании в качестве фидерного слоя свежеизолированных эмбриональных фибробластов кур. В этом варианте первично выделенную из эмбрионов суспензию клеток высевали в чашки Петри (d = 100 мм) и культивировали в течение нескольких суток без разделения по типам клеток, в результате чего фибробласты образовывали фидерный слой, на котором адгезировались ПЗК (рис. 3). При формировании фибробластами монослоя ПЗК переносили на новый фидерный слой, представленный культивируемыми эмбриональными фибробластами кур, обработанными митомицином С. После пересева ПЗК прикреплялись к клеткам фидера, однако через 18-24 ч инкубации отделялись от фидерного слоя и в дальнейшем, находясь в суспензии во взвешенном состоянии, сохраняли жизнеспособность в течение 1-2 сут.

При инкубации ПЗК на культивируемых куриных эмбриональных фибробластах и линии STO жизнеспособность ПЗК в культуре сохранялась не более 5 сут. При этом не было установлено существенных различий по продолжительности культивирования ПЗК в зависимости от используемых фидерных слоев. К тому же во всех случаях наблюдалась тенденция, практически аналогичная отмеченной выше: после переноса на фидерный слой ПЗК сначала прикреплялись с клеткам фидера, затем че-

рез 36-48 ч отделялись, и их дальнейшее культивирование происходило в суспензии в течение 2-3 сут.

Таким образом, выявлены оптимальные условия для получения примордиальных зародышевых клеток (ПЗК) из эмбрионов кур. Установлено, что эффективным методом дезагрегации с целью выделения эмбриональных клеток, в том числе ПЗК, служит ферментативная обработка эмбриона 0,05 % трипсином. При этом результат получения культуры эмбриональных клеток, максимально обогащенной ПЗК, зависит от возраста эмбриона и способа очистки ПЗК от клеток других типов. Максимальное количество ПЗК может быть выделено из 6-суточных эмбрионов с последующим разделением суспензии клеток по адгезии после 90 мин культивирования с использованием в качестве фидерного слоя культивируемых эмбриональных фибробластов кур.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ivarie R. Avian transgenesis: progress towards the promise. Trends Biotechnol., 2003, 21**:** 14-19.
2. McGrew M., Sherman A., Ellard F., Lillico S. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. EMBO Reports, 2004, 5: 728-733.
3. Sang H. Prospects for transgenesis in the chick. Mechanisms of Development, 2004, 121: 1179-1186.
4. Волкова Н.А., Томгорова Е.К., Багиров В.А., Белоглазов Д.В., Зиновьева Н.А., Волкова Л.А., Эрнст Л.К. Генетическая трансформация клеток кур in vitro и in vivo с использованием ретровирусных векторов С.-х. биол., 2009, 6: 44-48.
5. Эрнст Л.К., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А. Некоторые аспекты использования трансгенных технологий в животноводстве. С.-х. биол., 2009, 2: 4-9.
6. Scott B.B., Velho T.A., Sim S., Lois C. Applications of avian transgenesis. ILAR J., 2010, 51(4): 353-61.
7. Byun S.J., Kim S.W., Kim K.W., Kim J.S., Hwang I.S., Chung H.K., Kan I.S., Jeon I.S., Chang W.K., Park S.B., Yoo J.G. Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens. Biosci. Biotechnol. Biochem., 2011, 75(4): 646-649.
8. Petitte J., Mozdziak P. Production of transgenic poultry. In: Transgenic technology: a laboratory handbook second edition /C.A. Pinkert (ed.). N.Y., 2002: 279-306.
9. Petitte J., Liu G., Yang Z. Avian pluripotent stem cells. Mechanisms of Development, 2004, 121: 1159-1168.
10. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., 1953.
11. Животная клетка в культуре (методы и применение в биотехнологии) /Под ред. Л.П. Дьяконова. М., 2009.

[1]ГНУ Всероссийский НИИ животноводства Россельхозакадемии,
142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,
e-mail: natavolkova@inbox.ru, n_zinovieva@mail.ru;
[2]Российская академия сельскохозяйственных наук,
117218 г. Москва, ГСП-7, ул. Кржижановского, 15, корп. 2

Поступила в редакцию
15 октября 2012 года

ISOLATION AND CHARACTERISTICS OF PRIMORDIAL GERM CELLS IN CHICKEN

E.K. Tomgorova[1], N.A. Volkova[1], L.A. Volkova[1], V.I. Fisinin[2], N.A. Zinovieva[1]

Summary

Optimized conditions for isolation of primordial germ cells in chicken and their description are given. Trypsinization (with 0.05 % trypsin) was found to be the most effective method of disaggregation in chick embryos for isolation of their embryonic cells. The maximum number of primordial germs cells can be isolated from 6 days-old embryos, followed by separation of the resulting cell suspension by adhesion after 90 minutes of their cultivation with the use of chicken embryonic fibroblasts as feeder layer. During incubation of primordial germ cells on feeder layer cells remained viable for a longer time, and ranged from 5 to 7 days, depending on the type of cells used as feeder layer (finite cell line STO, recently separated and incubated for several passages in chicken embryo fibroblasts).