

УДК: 636.01/5:636.5:636.082:636.018  
DOI: 10.52419/issn2072-2419.2024.4.501

## ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОДЕЛИ ХОРИОАЛЛАНТОИСНОЙ МЕМБРАНЫ (ХАМ) ПРИ СОЗДАНИИ КРИБАНКА ГЕНЕРАТИВНЫХ КЛЕТОК САМОК *GALLUS GALLUS DOMESTICUS*

Станишевская О.И. – д-р биол. наук, гл. науч. сотр., зав. лабораторией генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц (ORCID 0000-0001-9504-3916); Силукова Ю.Л. – мл. науч. сотр. лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц (ORCID 0000-0003-1905-6373); Мирзакаева И.И. – лаборант-исследователь лаборатории генетики, разведения и сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц

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»

\*olgastan@list.ru

**Ключевые слова:** хориоаллантаическая мембрана кур, эмбрионы, гонады, яичники кур, трансплантация.

**Key words:** chicken chorioallantoic membrane, embryos, gonads, chicken ovaries, transplantation

**Финансирование:** Настоящее исследование проведено по теме НИР 124020200127-7 «Изучение молекулярно-биологических основ формирования воспроизводительных функций и совершенствование биотехнологий, направленных на повышение и эффективное использование репродуктивного потенциала сельскохозяйственных животных»

Поступила: 08.10.2024

Принята к публикации: 02.12.2024  
Опубликована онлайн: 16.12.2024



### РЕФЕРАТ

Одним из перспективных направлений сохранения женских репродуктивных клеток класса птиц (*Aves*) является использование эмбриональных тканей репродуктивных органов и клеток. Оценка эффективности методов замораживания тканей женских репродуктивных органов птиц должна основываться на простоте и доступности. Модель хориоаллантаической мембраны кур (ХАМ) может быть доступным эффективным подходом при оценке качества заморожено/оттаянных тканей яичников птиц для последующей ортотопной трансплантации. Целью исследования было определить возраст эмбрионов кур для получения дифференцированных по полу гонад и провести оценку жизнеспособности трансплантированных эмбриональных женских гонад на хориоаллантаической мембране по их неоваскуляризации в мезенхиме для использования в дальнейшем данных методов скрининга при криоконсервации эмбриональных женских гамет кур. Для получения эмбриональных женских гонад использовали оплодотворенные яйца кур поро-

ды русская белая после инкубации в течение 9-и суток – 10 шт., и в течение 17-и суток – 10 шт. (в 3х повторностях). Количество васкуляризированных донорских гонад после трансплантации на ХАМ реципиента от эмбрионов в возрасте 9-и суток составило 75,0% от общего числа трансплантатов; от эмбрионов в возрасте 17-и суток этот показатель составил 63,6%. Представленные данные предназначены для практической оценки модели трансплантации ткани эмбриональных яичников доноров с использованием ХАМ реципиента с целью последующего ее использования при оценке эффективности протокола витрификации эмбриональных тканей гонад кур, а также в протоколе получения гонадных зародышевых клеток (GGCs) из эмбриональных тканей яичников кур от 9-суточных эмбрионов и трансплантации тканей эмбриональных яичников от 17-суточных эмбрионов.

#### ВВЕДЕНИЕ / INTRODUCTION

Современные методы сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственных птиц, в отличие от млекопитающих, включают в себя возможности сохранения только мужской части популяции генофондных пород. Сохранение женского генома класса *Aves*, в настоящее время, остается на уровне разработки и апробации методов.

Однако, для сохранения редких и исчезающих генофондных пород сельскохозяйственных птиц, находящихся на грани исчезновения, необходимо использовать весь спектр знаний и методов, чтобы обеспечить поддержание генетического разнообразия и использовать возможность его восстановления.

Последние достижения в области криоконсервации и технологии восстановления пород домашней птицы с помощью спермы, стволовых клеток, соматических клеток и гонад открывают перспективы для создания биобанков, хотя каждое из них имеет четкие различия и ограничения с точки зрения практичности, осуществимости, эффективности и стоимости [1]

Одним из перспективных направлений сохранения женских репродуктивных клеток класса *Aves* является использование эмбриональных тканей репродуктивных органов и клеток. Использование совокупности методов и протоколов криоконсервации тканей яичников кур и хирургической трансплантации может способствовать сохранению женских зародышевых клеток. Существующие протоколы медленного и быстрого замораживания тканей репродуктивных органов

необходимо верифицировать с использованием доступных методов оценки жизнеспособности сохраняемых тканей репродуктивных органов самок птиц [2,3], однако эффективность овариэктомии донорских яичников реципиентам не позволила получить 100% потомство от донора из-за неполного удаления функциональной ткани яичников реципиента [1]. В 2007 году Y. Song и F. G. Silverside представили результаты проведенного исследования, в котором яичники суточных цыплят были пересажены цыплятам-реципиентам аналогичного возраста, и после достижения половой зрелости пересаженная ткань яичника полноценно функционировала [4].

Наиболее простой системой скрининга жизнеспособности будущих трансплантатов женских эмбриональных гонад кур является хориоаллантоисная мембрана куриного эмбриона (ХАМ) с высокой степенью васкуляризации [5]. Хориоаллантоисная мембрана эмбрионов кур обеспечивает через непрерывную систему кровообращения функции дыхания, транспорта кальция из яичной скорлупы, кислотно-щелочной гомеостаз и реабсорбцию воды и др. [6].

Целью нашего исследования было определить возраст эмбрионов кур для получения дифференцированных по полу гонад и провести оценку жизнеспособности трансплантированных эмбриональных женских гонад на хориоаллантоисной мембране по их неоваскуляризации в мезенхиме для использования в дальнейшем данных методов скрининга при криоконсервации эмбриональных жен-

ских гамет кур.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ / MATERIALS AND METHODS

Для получения эмбриональных женских гонад использовали оплодотворенные яйца кур породы фавероль и русская белая после инкубации в течение 9-и суток – 10 шт., и в течение 17-и суток – 10 шт. Инкубацию яиц проводили в стандартном режиме при температуре 37,5°C и относительной влажности 63-65%. Закладку яиц для инкубации проводили так, чтобы гонады необходимого возраста были получены одновременно. Эмбриональные женские гонады отделяли с использованием микрохирургических ножниц и переносили в питательную среду Дюльбекко на 1-1,5 ч, после чего проводили трансплантацию на ХАМ. Опыт проведен в 3х повторностях.

Для получения ХАМ использовали оплодотворенные яйца кур породы русская белая (10 шт.). На 3 сутки инкубации проводили подготовку хориоаллантоисной мембраны по следующему протоколу: яйца обрабатывали 70% этиловым спиртом, затем, минимально травмируя яйцо, острым концом скальпеля делали отверстие в скорлупе на остром конце яйца и отбирали стерильным шприцом 2,0 мл белка для увеличения просвета между ХАМ и подскорлупной оболочкой для предотвращения ее срачивания с сосудами аллантоиса. Далее, для доступа к хориоаллантоисной мембране на боковой части яйца выпиливали окно размером 15x10 мм, не повреждая подскорлупную мембрану (рис.1). Окно закрывали медицинским пластырем на тканевой основе и продолжали инкубацию до 10-и суток.

Трансплантацию донорских эмбриональных гонад на ХАМ проводили следующим образом: вскрывали подскорлупную мембрану, на поверхности хориоаллантоисной мембраны размещали силиконовое кольцо, изготовленное из медицинской силиконовой трубки с внутренним диаметром 5 мм, предварительно антисептически обработанное. В центр силиконового кольца с помощью микрохирургических щипцов помещали извлеченные

эмбриональные женские гонады, полученные от эмбрионов после 9-и и 17-и суток инкубации. Закрывали окно на поверхности яйца пластырем и продолжали инкубацию еще в течение 5 суток.

Степень неоваскуляризации эмбриональных женских гонад на ХАМ на 5й день инкубирования оценивали визуально с использованием стереоскопического микроскопа МСП-2 при увеличении х60, а также путем оценки гистологических препаратов.

Для гистологического исследования брали женские эмбриональные гонады кур на 9-й и 17-й день инкубации, а также донорские ткани эмбриональных гонад после инкубации на ХАМ реципиента на 5й день инкубирования. Образцы фиксировали в растворе Буэна. Фиксированные образцы заливали парафином, делали серийные срезы на микротоме толщиной 4 мкм, окрашивали гематоксилином/эозином и анализировали под микроскопом (увеличение х200, х400 Motic, Китай).

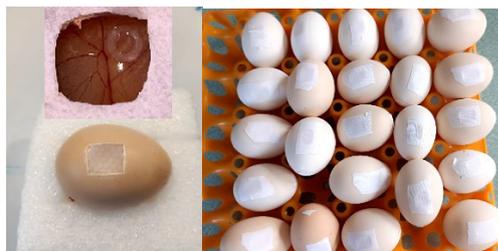


Рисунок 1 – Подготовка эмбрионов-реципиентов.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ / RESULTS

Поскольку определено, что дифференциация гонад в семенники или яичники завершает третью критическую фазу – 8-и суток инкубации [7,8], в нашей работе извлечение гонад осуществляли на 9-и сутки инкубации после критической фазы для полной визуальной достоверности гонадной дифференцировки (рис. 2). 17-е сутки инкубации для получения эмбриональных гонад (рис. 3) были выбраны по следующим причинам: во-первых, данный возраст эмбриона позволяет оценить развитие фолликулов гистологическим

методом, во-вторых, данный период развития эмбрионов характеризуется спадом уровня альфа-фетопротеина, который предохраняет эмбрион от развития иммунологического конфликта [9] и снижает влияние материнского организма, что может, по нашему мнению, способствовать успешной ксенотрансплантации на ХАМ. Гонады эмбрионов более старшего возраста становятся менее пригодны для целей ортотрансплатации из-за возможного иммунного конфликта между донорским яичником и эмбрионом-реципиентом. Из данных проведенных экспериментов следует, что количество полученных эмбриональных женских гонад, пригодных для последующего замораживания, составило 32-35% от общего числа оцененных эмбрионов в зависимости от возраста (табл. 1, рис. 2-3).

В свою очередь, количество эмбрионов, оцененных по развитию ХАМ, и пригодных в качестве реципиентов составило не более 40% (рис. 5 и рис. 6). Эмбрионы различались по развитию кровеносной системы и толщине сосудов ХАМ. Для успешной приживляемости донорских тканей гонад необходимо размещать фрагмент ткани в наиболее васкуляризированной зоне ХАМ. Количество васкуляризированных донорских гонад от эмбрионов в возрасте 9-и суток составило 75,0% от общего числа трансплантатов; от эмбрионов в возрасте 17-и суток этот показатель составил 63,6%.

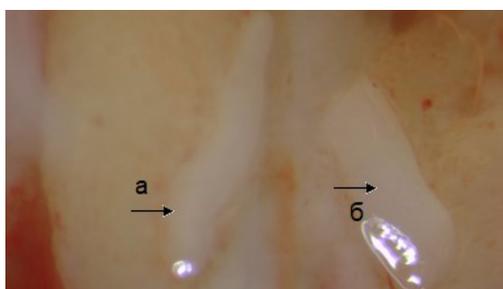


Рисунок 2 – Дифференцированные по полу эмбриональные гонады кур (9 суток инкубации). а) правая гонада (начальная стадия дегенерации); б) левый увеличенный яичник.

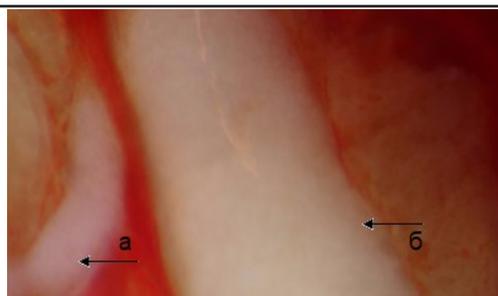


Рисунок 3 – Дифференцированные по полу эмбриональные гонады кур (17 суток инкубации). а) редуцированная правая гонада; б) левый увеличенный яичник.

Результаты трансплантации фрагментов донорских тканей эмбриональных гонад на ХАМ оценивали визуально на стереомикроскопе по наличию мелкой сосудистой сетки (неоваскуляризации) по покровному эпителию фрагментов тканей донорских эмбриональных яичников (рис. 4-6). Оценку развития эмбриональных гонад и фолликул проводили на срезах гистологических препаратов, на рисунках 7 и 8 представлены изменения размеров гонад и размеров и количества фолликулов в зависимости от возраста эмбрионов. В возрасте эмбриона 17 суток отмечено существенное снижение числа оогоний, что соответствует нормальному развитию генеративных клеток в эмбриональный период.

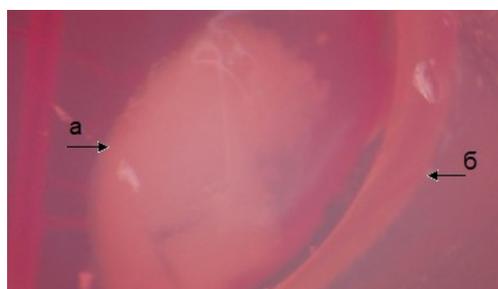


Рисунок 4 – Эмбриональный яичник кур на ХАМ перед инкубацией: а) фрагмент эмбриональной гонады; б) силиконовое кольцо.

**Таблица 1 – Показатели приживаемости эмбриональных гонад кур (яичников) на хориоаллантоисной мембране**

| Показатель                        | Всего оценено эмбрионов, шт. | Кол-во яичников, полученных для трансплантации, шт. | Кол-во гонад трансплантированных на ХАМ, шт. | Кол-во васкуляризированных донорских гонад, шт. |
|-----------------------------------|------------------------------|---|--|---|
| - эмбрионов в возрасте 9-и суток  | 28 (12♀)                     | 9 (32,1%)   | 8  | 6 (75,0%)                                       |
| - эмбрионов в возрасте 17-и суток | 34 (12♀)                     | 12 (35,3%)  | 11   | 7 (63,6%)                                       |

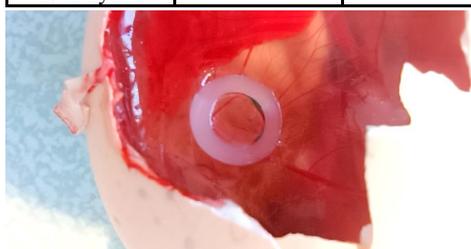


Рисунок 5 – Фото развития ХАМ с размещенной эмбриональной гонадой после инкубации в течение 5-и суток.

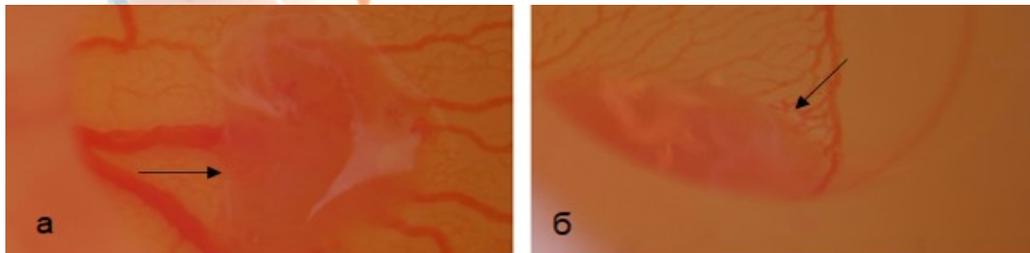


Рисунок 6 – Изображение фрагментов донорских эмбриональных гонад с васкуляризацией по покровному эпителию после 5-и суток инкубации на ХАМ (увеличение x20) полученных от эмбрионов: а) трансплантированный яичник 9-суточного эмбриона; б) трансплантированный яичник 17-суточного эмбриона.

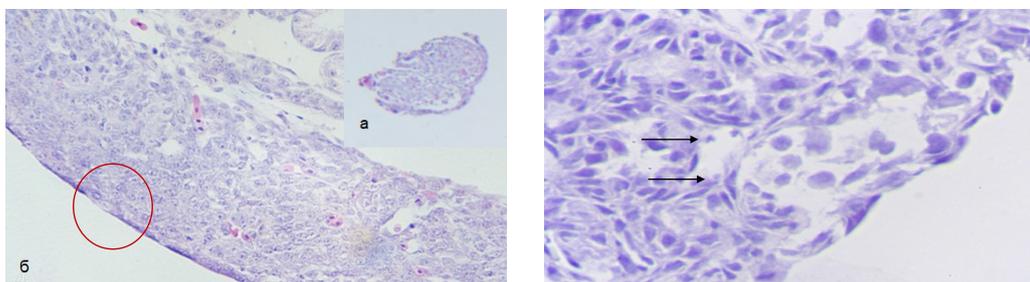


Рисунок 7 – Снимок фрагмента гистологического препарата эмбрионального яичника (9 суток) – генеративная фаза развития первичных гонадных половых клеток: а) увеличение x100, б) увеличение x400.

Рисунок 8 – Снимок фрагмента гистологического препарата эмбрионального яичника (17 суток) – обозначены первичные фолликулы (увеличение x400).

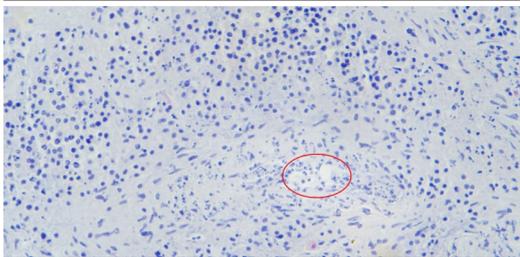


Рисунок 9 – Фрагмент изображения гистологического среза трансплантированного эмбрионального яичника (9 суток) после инкубации на ХАМ в течение 5 суток: выделен фрагмент неоваскуляризации ткани яичника.

Оценка неоваскуляризации гистологического среза трансплантированного донорского яичника после инкубации в течение 5 суток на ХАМ показала различие по количеству мелких сосудов, которое составило у эмбрионов в возрасте 9-и суток 2-3 шт. в поле зрения, у эмбрионов в возрасте 17-и суток – 1-2 шт. в поле зрения (рис. 9).

Полученные результаты показывают, что возможно эффективное использование эмбриональных гонад кур генофондных пород в возрасте 9-и и 17-и суток инкубации, для последующего их хранения *in vitro*, ввиду возможности их успешной последующей трансплантации курам-реципиентам.

Хориоаллантаиновая мембрана может служить моделью для тестирования биосовместимости эмбриональных тканей гонад кур для различных пород для последующей ксенотрансплантации наиболее подходящим породам-реципиентам. Также представленная модель оценки жизнеспособности эмбриональных гонад кур может использоваться для определения необходимого количества женских гонад при хранении *in vitro* при установлении прогнозируемого уровня приживляемости трансплантируемых репродуктивных органов на основе модели ХАМ.

#### ВЫВОДЫ / CONCLUSION

Эффективность методов витрификации эмбриональных гонад кур и низкотемпературного хранения *in vitro* требует дальнейшей разработки и апробации. Кроме того, не выяснена эффективность трансплантации донорских эмбриональных репродуктивных органов живым реципиентам и возможность получения от них потомства.

Проведенное исследование позволяет оценить преимущество модели ХАМ ре-

ципиента при оценке качества трансплантируемого донорского репродуктивного материала при создании криобанка гермоплазмы самок сельскохозяйственных птиц. Несомненно, что сохранение генеративных клеток самок птиц в условиях низкотемпературного хранения затребует проведения значительного количества исследований по разработке и оценке методов замораживания репродуктивных клеток, их трансплантации в виде тканей или при использовании гонадных зародышевых клеток (GGCs), извлеченных из гонад на ранней половой дифференциации. В настоящий момент исследования в данном направлении ведутся многими научными лабораториями мира.

#### PRACTICAL USE OF THE CHORIOALLANTOIC MEMBRANE (CAM) MODEL IN THE CREATION OF A CRYOBANK OF GENERATIVE CELLS OF FEMALE GALLUS GALLUS DOMESTICUS

**Stanishevskaya O.I.** – Doctor (Biology), Chief, head. laboratory of Genetics, breeding and conservation of genetic resources of farm birds (ORCID 0000-0001-9504-3916), **Silyukova Y.L.** – PhD (Biology), researcher laboratories of genetics, breeding and conservation of genetic resources of farm birds (ORCID 0000-0003-1905-6373)? **Mirzakaeva I.I.** – laboratory assistant researcher at the Laboratory of Genetics, breeding and conservation of genetic resources of farm birds

The All-Russian Scientific Research Institute of Genetics and Breeding of Farm Animals is a branch of the Federal State Budgetary Scientific Institution "Federal Research Center for Animal Husbandry – VIZ named after Academician L. K. Ernst"

\*olgastan@list.ru

**Funding:** *This study was conducted under the research topic 124020200127-7 "Study of the molecular biological foundations of the formation of reproductive functions and improvement of biotechnologies aimed at increasing and effectively using the reproductive potential of farm animals"*

#### ABSTRACT

One of the promising areas for preserving female reproductive cells of the Aves class is the use of embryonic tissues of reproductive organs and cells. Evaluation of the effectiveness of freezing methods for female reproductive organs of birds should be based on simplicity and availability. The chicken chorioallantoic membrane (CAM) model can be an accessible and effective approach to assessing the quality of frozen/thawed avian ovarian tissues for subsequent orthotopic transplantation. The aim of the study was to determine the age of chicken embryos for obtaining sex-differentiated gonads and to evaluate the viability of transplanted embryonic female gonads on the chorioallantoic membrane by their neovascularization in the mesenchyme for further use of these screening methods in cryopreservation of embryonic female gametes of chickens. To obtain embryonic female gonads, fertilized eggs of Russian White chickens were used after incubation for 9 days - 10 pcs, and for 17 days - 10 pcs (in 3 replicates). The number of vascularized donor gonads after transplantation to the recipient's CAM from 9-day-old embryos was 75.0% of the total number of transplants; from 17-day-old embryos it was 63.6%. The presented data are intended for practical evaluation of the model of transplantation of donor embryonic ovarian tissue using the recipient's CAM for the purpose of its subsequent use in assessing the effectiveness of the vitrification protocol for embryonic gonadal tissues of chickens, as well as in the protocol for obtaining gonadal germ cells (GGCs) from embryonic ovarian tissues of chickens from 9-day-old embryos and transplantation of embryonic ovarian tissues from 17-day-old

embryos.

#### СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sun, Y. Poultry genetic heritage cryopreservation and reconstruction: advancement and future challenges / Sun Y., Li, Y., Zong, Y. et al // J Animal Sci Biotechnol. 2022. – Vol. 13. – P. 115. doi:10.1186/s40104-022-00768-2
2. Song, Y. Offspring produced from orthotopic transplantation of chicken ovaries / Song Y., Silversides F.G. // Poult Sci. 2007. – Vol. 86(1). – P. 107-111. doi: 10.1093/ps/86.1.107.
3. Fujihara, M. Cryopreservation Competence of Chicken Oocytes as a Model of Endangered Wild Birds: Effects of Storage Time and Temperature on the Ovarian Follicle Survival / Fujihara M., Shiraishi J.-i., Onuma M., et al. // Animals. 2022. – Vol. 12. P. 1434. doi:10.3390/ani12111434
4. Song, Y. The Technique of Orthotopic Ovarian Transplantation in the Chicken / Song Y., Silversides F. // – Poultry science. – 2006. – Vol. 85 – P. 1104-1006. Doi: 10.1093/ps/85.6.1104
5. Hossay, C. The Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Model as a Tool to Study Ovarian Tissue Transplantation / Hossay C., Cacciottola L., Storder S., et al. // J Vis Exp. 2023. – Vol. 23(196). doi: 10.3791/64867.
6. Pink, D. Parseghian MH. High efficacy vasopermeability drug candidates identified by screening in an ex ovo chorioallantoic membrane model / Pink D., Luhrs K.A., Zhou L., et. al. // Sci Rep. 2015. – Vol. 29 (5). – P. 15756. doi: 10.1038/srep15756.
7. Хохлов, Р. Ю. Особенности морфологической дифференцировки яичника кур в онтогенезе / Р. Ю. Хохлов // Нива Поволжья. – 2009. – № 2(11). – С. 94-98.;
8. Хохлов, Р. Ю. Морфогенез яичника куриного эмбриона в зародышевом периоде эмбрионального онтогенеза / Р. Ю. Хохлов, С. И. Кузнецов // Международный вестник ветеринарии. 2022. – № 4. – С. 353-356. – DOI 10.52419/issn2072-2419.2022.4.353.)
9. Альфа-фетопротейн / В. А. Черешнев [и др.]; Рос. акад. наук, Ур. отд-ние, Ин-т иммунологии и физиологии УрО РАН,

Перм. гос. мед. акад. МЗ РФ, ЗАО "Ин-т новых мед. технологий" ; [отв. ред. Н. Н. Кеворков]. – Екатеринбург: УрО РАН, 2004. – 375 с.

#### REFERENCES

1. Sun, Y. Poultry genetic heritage cryopreservation and reconstruction: advancement and future challenges / Sun Y., Li, Y., Zong, Y. et al // *J Animal Sci Biotechnol*. 2022. – Vol. 13. – P. 115. doi:10.1186/s40104-022-00768-
2. Song, Y. Offspring produced from orthotopic transplantation of chicken ovaries / Song Y., Silversides F.G. // *Poult Sci*. 2007. – Vol. 86(1). – P. 107-111. doi: 10.1093/ps/86.1.107.
3. Fujihara, M. Cryopreservation Competence of Chicken Oocytes as a Model of Endangered Wild Birds: Effects of Storage Time and Temperature on the Ovarian Follicle Survival / Fujihara M., Shiraishi J.-i., Onuma M., et al. // *Animals*. 2022. – Vol. 12. P. 1434. doi:10.3390/ani12111434
4. Song, Y. The Technique of Orthotopic Ovarian Transplantation in the Chicken / Song Y., Silversides F. // – *Poultry science*. – 2006. – Vol. 85 – P. 1104-1006. Doi: 10.1093/ps/85.6.1104
5. Hossay, C. The Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) Model as a Tool to Study Ovarian Tissue Transplantation / Hossay C., Cacciottola L., Storder S., et al. // *J Vis Exp*. 2023. – Vol. 23(196). doi: 10.3791/64867.
6. Pink, D. Parseghian MH. High efficacy vasopermeability drug candidates identified by screening in an ex ovo chorioallantoic membrane model / Pink D., Luhrs K.A., Zhou L., et. al. // *Sci Rep*. 2015. – Vol. 29 (5). – P. 15756. doi: 10.1038/srep15756.
7. Hohlov, R. Yu. Osobennosti morfolo-gicheskoy differencirovki yaichnika kur v ontogeneze / R. Yu. Hohlov // *Niva Pov-olzh'ya*. – 2009. – № 2(11). – S. 94-98.;
8. Khokhlov R.Y., Kuznetsov S.I. Morpho-genesis of the ovary of a chicken embryo in the germinal period of embryonic ontogene-sis. *International Journal of Veterinary Medicine*. 2022;(4):353-356. (In doi.org/10.52419/issn2072-2419.2022.4.353
9. Al'fa-fetoprotein / V. A. Chereshnev [i dr.] ; Ros. akad. nauk, Ur. otd-nie, In-t im-munologii i fiziologii UrO RAN, Perm. gos. med. akad. MZ RF, ЗАО "In-t novyh med. tekhnologij" ; [otv. red. N. N. Kevorkov]. – Ekaterinburg: UrO RAN, 2004. – 375 s.