

УДК 636.52/.58:591.463.1:[573.6.086.83+577.21]

## ВОЗРАСТНАЯ ДИНАМИКА СПЕРМАТОГЕНЕЗА У ПЕТУХОВ В СВЯЗИ С ОПТИМИЗАЦИЕЙ СРОКОВ БИОИНЖЕНЕРНЫХ МАНИПУЛЯЦИЙ\*

Е.В. БЕЛОГЛАЗОВА<sup>1</sup>, Т.О. КОТОВА<sup>1</sup>, Н.А. ВОЛКОВА<sup>1</sup>, Л.А. ВОЛКОВА<sup>1</sup>,  
Н.А. ЗИНОВЬЕВА<sup>1</sup>, Л.К. ЭРНСТ<sup>2</sup>

У разновозрастных петухов в возрасте от 1 нед до 12 мес изучали морфологическую структуру ткани семенника и распределение клеток сперматогенного эпителия в семенных канальцах. Установлено, что оптимальным возрастом для проведения биоинженерных манипуляций с половыми клетками семенников петухов можно считать период от 1 до 6 нед, когда генеративные клетки семенных канальцев представлены в основном сперматогониями.

**Ключевые слова:** петух, семенник, сперматогонии, сперматогенез.

**Keywords:** cock, testis, spermatogonia, spermatogenesis.

Использование клеток гонад рассматривается как один из перспективных методов получения трансгенных животных, в том числе птицы (1-3). Несмотря на наличие различных приемов доставки генетической информации в эмбриональные клетки птицы (4-9), интерес к использованию клеток семенников сохраняется вследствие их природной способности поглощать чужеродную ДНК (чДНК) и переносить ее в яйцеклетку в процессе оплодотворения. При этом интегрированная в геном организма чДНК может устойчиво передаваться в ряде поколений. Ввиду проведения манипуляций на взрослых животных значительно сокращаются материальные и временные затраты на получение трансгенного потомства.

Среди всех типов клеток сперматогенного эпителия наибольший интерес для исследователей представляют стволовые клетки — сперматогонии. Популяция клеток этого типа постоянно обновляется, что открывает широкие возможности для реализации их потенциала при создании трансгенной птицы. Репликация ДНК в сперматогониях инициирует комплексный процесс их дифференцировки, приводящий к появлению высокоспециализированных половых клеток — спермиев.

Мы изучили динамику сперматогенеза у петухов и определили оптимальные сроки введения рекомбинантной ДНК в половые клетки на ранних стадиях их дифференцировки с целью повышения эффективности процедуры получения трансгенной птицы.

*Методика.* Гистологические исследования тканей семенника у петухов ( $n = 65$ ) проводили в 19 возрастных категориях (от 1 нед до 12 мес, в каждой группе по 5 гол.), материал отбирали при убое птицы.

Для фиксации семенников использовали раствор Буэна (15 мл пикриновой кислоты, 5 мл 40 % формалина, 1 мл ледяной уксусной кислоты), в котором образцы выдерживали не менее 24 ч. Дегидратацию и заливку образцов ткани в парафин выполняли по общепринятой методике (10). Срезы, приготовленные на ротационном микротоме, окрашивали растворами гематоксилина и эозина («Биовитрум», Россия). Для изучения полученных гистопрепаратов использовали микроскоп фирмы «Ортоп» (Германия) (объективы  $\times 40$ ,  $\times 16$ ) и программу Image Scope (ООО «Системы для микроскопии и анализа», г. Москва). Учитывали только семенные канальцы, имеющие округлую форму. От каждого петуха проанализировали не

\* Исследования выполнены при финансовой поддержке Минобрнауки РФ, проект № 11.519.11.2024.

менее 30 семенных канальцев. Клетки эпителиосперматогенного слоя идентифицировали по морфологии.

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

**Результаты.** Гистоструктура семенника у петухов была аналогична таковой у млекопитающих. Паренхиме формировала система извитых семенных канальцев, сливающихся в области средостения в прямые, а затем в выносящие каналы. Каждый извитой семенной каналец покрывала соединительнотканная оболочка, внутренний слой которой был образован базальной мембраной с располагающимся на ней эпителиосперматогенным слоем. Этот слой представляли две популяции клеток — поддерживающие клетки (клетки Сертоли) и сперматогенные клетки на разных стадиях дифференцировки (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды, спермии).

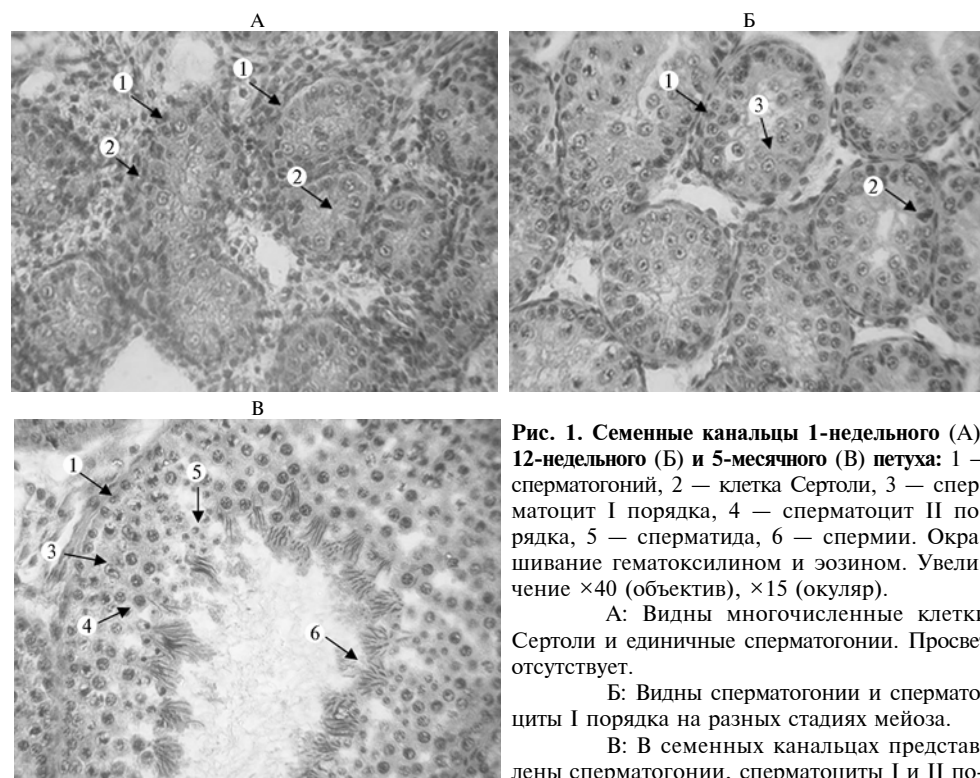
С возрастом число семенных канальцев на единицу площади ткани семенника изменялось (табл.). В период до 12 нед изменения были незначительными: число семенных канальцев на 1 мм<sup>2</sup> среза снижалось в среднем на 46,3 % (от 201±22 до 108±12 шт.) при 2,5-кратном увеличении числа клеток в канальце (от 25,0±0,3 до 62,0±0,4 шт.). В последующий период (с 3 до 6 мес) изменения становились более выраженными. За счет значительного увеличения размеров канальцев снижалось их число на единицу площади среза (в среднем до 18±2 шт. на 1 мм<sup>2</sup>, или в 6 раз по сравнению с показателем в предыдущий период). Это было связано прежде всего с увеличением числа клеток в эпителиосперматогенном слое канальцев (более чем в 18 раз по сравнению с их числом в 3-месячном возрасте — до 1153,9±7,6 шт.). В период с 6 до 12 мес размеры канальцев и число клеток в них практически не изменялись.

**Возрастная динамика морфологических показателей ( $X \pm x$ ), характеризующих гистоструктуру семенника у петухов**

Возраст	Среднее число, шт.		Диаметр семенных канальцев, мкм	Площадь семенных канальцев, мкм <sup>2</sup>
	семенных канальцев на 1 мм <sup>2</sup>	сперматогенных клеток в семенном канальце		
1 нед	201±22	25,0±0,3	50,5±1,2	1871±82
2 нед	188±9	30,0±0,3	61,4±1,1	2715±93
3 нед	170±7	30,0±0,2	60,8±0,9	2638±74
4 нед	145±9	31,0±0,3	62,1±0,5	2771±40
5 нед	136±8	30,0±0,3	62,1±0,6	2795±59
6 нед	127±6	40,0±0,4	67,0±0,8	3207±71
7 нед	129±11	38,0±0,4	66,7±0,6	3203±55
8 нед	131±9	44,0±0,4	65,0±0,8	3036±76
9 нед	122±10	50,0±0,8	68,0±0,9	3331±97
10 нед	116±9	58,0±0,5	69,1±1,0	3368±90
11 нед	117±8	54,0±0,5	73,0±1,5	3862±153
12 нед	108±12	62,0±0,4	86,2±0,9	5348±116
3,5 мес	88±3	70,0±0,6	97,2±2,3	6963±306
4 мес	74±7	226,0±1,7	111,7±1,1	8962±172
4,5 мес	62±6	291,0±1,8	169,0±10,8	27787±282
5 мес	17±2	711,0±5,6	191,9±2,0	27092±564
5,5 мес	15±2	913,0±6,0	195,0±2,6	27877±525
6 мес	18±2	1154,0±7,6	186,8±2,0	23760±491
12 мес	15±3	1148,0±10,6	216,2±6,3	36254±2297

Вариабельность возрастных изменений в гистоструктуре ткани семенника петухов была обусловлена особенностями развития клеток эпителиосперматогенного слоя. В возрасте 7 сут в семенных канальцах встречались два типа клеток: клетки Сертоли и ранние половые клетки — сперматогонии; их число в одном семенном канальце достигало соответственно 16,0±0,3 и 9,0±0,2 шт. (рис. 1, А). Клетки Сертоли располагались на периферии семенного канальца и имели ядро пирамидальной или овальной формы, расположенное перпендикулярно базальной мембране. Сперматогонии

характеризовались наличием хорошо оформленного крупного ядра со светлой цитоплазмой и встречались как на периферии, так и внутри семенного канальца. На этой стадии развития просвет семенного канальца отсутствовал.



**Рис. 1.** Семенные канальцы 1-недельного (А), 12-недельного (Б) и 5-месячного (В) петуха: 1 — сперматогоний, 2 — клетка Сертоли, 3 — сперматоцит I порядка, 4 — сперматоцит II порядка, 5 — сперматиды, 6 — спермии. Окрашивание гематоксилином и эозином. Увеличение  $\times 40$  (объектив),  $\times 15$  (окуляр).

А: Видны многочисленные клетки Сертоли и единичные сперматогонии. Просвет отсутствует.

Б: Видны сперматогонии и сперматоциты I порядка на разных стадиях мейоза.

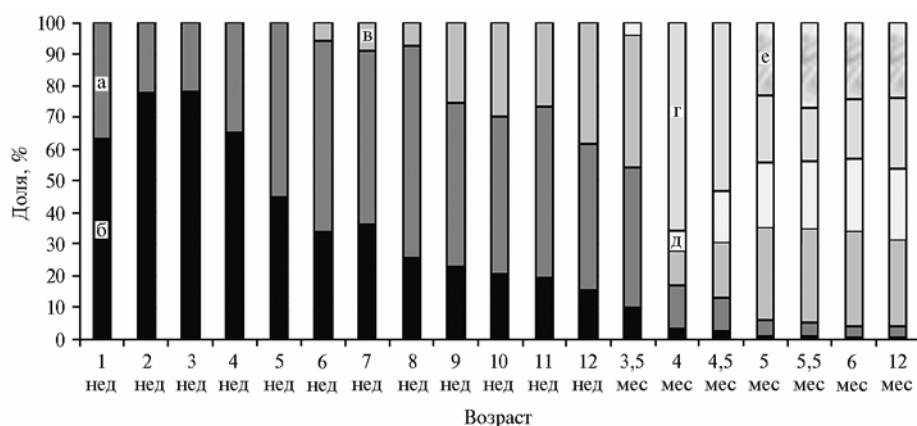
В: В семенных канальцах представлены сперматогонии, сперматоциты I и II порядка на различных стадиях мейоза, сперматиды, а также спермии.

В возрасте 14 сут наблюдалась концентрация сперматогониев по периферии семенного канальца. Между петлями извитых канальцев в рыхлой неоформленной соединительной ткани встречались хорошо различимые интерстициальные клетки. Число клеток Сертоли в семенном канальце увеличивалось до  $23,0 \pm 0,2$  шт., число сперматогониев при этом не изменялось —  $7,0 \pm 0,1$  шт. В 3 нед в некоторых семенных канальцах появлялся просвет. При этом число половых клеток значительно не менялось. У 4-недельных петухов число клеток Сертоли в семенном канальце снижалось до  $20,0 \pm 0,2$  шт., сперматогониев — незначительно увеличивалось (до  $11,0 \pm 0,1$  шт.).

В 5-недельном возрасте практически во всех семенных канальцах отчетливо выявлялся просвет. Клетки сперматогенного ряда располагались по базальной мембране. Наблюдалась физиологическая гибель части клеток Сертоли. Число клеток этого типа снижалось до  $14,0 \pm 0,3$ , сперматогониев — напротив, увеличивалось до  $15,5 \pm 0,2$  шт. При этом встречались делящиеся формы сперматогониев — на стадиях профазы и метафазы (промежуточные клетки). В возрасте 6-7 нед размер семенных канальцев продолжал увеличиваться, внутри них четко выявлялся просвет. Между клетками Сертоли почти сплошным слоем располагались сперматогонии. Число клеток Сертоли значительно не менялось ( $13,0 \pm 0,2$  шт.), сперматогониев — увеличивалось до  $24,1 \pm 0,2$  шт. Появился новый тип клеток сперматогенного ряда — сперматоциты I порядка. Последние (их число составляло  $3,3 \pm 0,2$  шт.) располагались во втором ряду от мембраны и имели округлую форму, большое ядро и светлую цитоплазму.

У 8-12-недельных петухов наблюдалось незначительное увеличение числа клеток эпителиосперматогенного слоя (см. рис. 1, Б). Клетки Сертоли располагались на стенке канальцев в один ряд. Между ними почти сплошным слоем размещались сперматогонии, число которых практически не изменялось и варьировало от  $26,0 \pm 0,1$  до  $29,0 \pm 0,2$  шт. Отмечалось значительное увеличение числа сперматоцитов I порядка — до  $24,0 \pm 0,2$  шт. У 3,5-месячных особей в некоторых семенных канальцах выявлялись сперматоциты II порядка (не более  $2,7 \pm 0,1$  шт.). Семенные канальцы 4-месячных петухов характеризовались наличием всех клеток сперматогенного эпителия, за исключением спермиев. Сперматогонии располагались на базальной мембране сплошным слоем, между ними были видны клетки Сертоли, имеющие типичную пирамидальную форму. Над сперматогониями в 2-3 ряда находились сперматоциты и ранние сперматиды. Число клеток Сертоли составляло  $7,0 \pm 0,1$ , сперматогониев —  $31,0 \pm 0,7$ , первичных и вторичных сперматоцитов на разных стадиях мейоза — соответственно  $25,0 \pm 0,4$  и  $14,5 \pm 0,4$ , молодых круглых сперматид —  $148,0 \pm 2,7$  шт.

В возрасте 4,5-5 мес сперматогенные клетки достигали уровня развития поздних грушевидных сперматид и зрелых спермиев (см. рис. 1, В). В семенных канальцах были видны все сперматогенные клетки, характерные для активного сперматогенеза, значительная часть семенных канальцев содержала зрелые спермии. Число клеток сперматогенного эпителия в этом возрасте колебалось в следующих пределах: сперматогонии —  $36,0 \pm 2,0$ , сперматоциты I и II порядка — соответственно  $209,0 \pm 4,7$  и  $146,0 \pm 1,8$ , сперматиды —  $151,0 \pm 1,9$ , спермии —  $162,0 \pm 2,1$  и клетки Сертоли —  $7,0 \pm 0,1$  шт. В 6 и 12 мес число клеток сперматогенного эпителия значительно не изменялось: для сперматогониев этот показатель равнялся соответственно  $40,0 \pm 2,5$  и  $38,0 \pm 1,4$ , для сперматоцитов I порядка —  $350,0 \pm 1,4$  и  $321,0 \pm 7,4$ , II порядка —  $263,0 \pm 5,8$  и  $262,0 \pm 3,8$ , для сперматид —  $216,0 \pm 4,2$  и  $262,0 \pm 3,8$ , для спермиев —  $279,0 \pm 1,6$  и  $277,0 \pm 3,6$  и для клеток Сертоли —  $6,0 \pm 0,2$  и  $7,0 \pm 0,3$  шт.



**Рис. 2.** Морфологический состав клеток эпителиосперматогенного слоя семенников у петухов в возрастной динамике: а — сперматогонии, б — клетки Сертоли, в — сперматоциты I порядка, г — сперматиды, д — сперматоциты II порядка, е — спермии.

Таким образом, у петухов в возрасте 1-6 нед основной тип клеток семенных канальцев — сперматогонии (рис. 2). Их наибольшее число выявляется в семенниках у 5-недельных особей. С 6-недельного возраста в семенных канальцах обнаруживаются сперматоциты I порядка, а с 3,5-4 мес — сперматоциты II порядка и сперматиды. В возрасте 5 мес в семенных канальцах петухов впервые выявляются спермии, число которых увеличивается к

6 мес и остается практически неизменным до 12-месячного возраста.

Итак, у петухов оптимальный возраст для выполнения биоинженерных манипуляций с половыми клетками семенников — 1-6 нед, поскольку в этот период генеративные клетки семенных канальцев представлены в основном сперматогониями.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Novgorodova I.P., Mormyshev A.N., Volkova N.A., Zinovieva N.A., Ernst L.K. In vivo genetic transformation of rabbit spermatogonia cells. *Biotechnology in Russia*, 2008, 1: 35-41.
2. Волкова Н.А., Зиновьева Н.А., Волкова Л.А., Лоцманова Н.С., Эрнст Л.К. Изучение факторов, влияющих на эффективность переноса генов в половые клетки самцов сельскохозяйственных животных. *С.-х. биол.*, 2010, 6: 16-19.
3. Волкова Н.А., Зиновьева Н.А., Волкова Л.А., Белоглазова Е.В., Котова Т.О., Эрнст Л.К. Генетическая трансформация сперматогониев петухов in vivo. *Докл. РАСХН*, 2011, 1: 45-47.
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. Волкова Н.А., Тулякова А.О., Волкова Л.А., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К., Томгорова Е.К., Лоцманова Н.С. Эффективность переноса экзогенной ДНК в клетки эмбрионов кур in vitro и in vivo с использованием ретровирусных векторов. *Докл. РАСХН*, 2007, 3: 37-38.
7. McGrew M., Sherman A., Ellard F., Lillico S. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Reports*, 2004, 5: 728-733.
8. Sang H. Prospects for transgenesis in the chick. *Mech. Develop.*, 2004, 121: 1179-1186.
9. Petite J., Mozzia P. Production of transgenic poultry. In: *Transgenic technology: a laboratory handbook second edition* /C.A. Pinkert (ed.). N.Y., 2002: 279-306.
10. Ромейс Б. Микроскопическая техника. М., 1953.

<sup>1</sup>ГНУ Всероссийский НИИ животноводства  
Россельхозакадемии,  
142132 Московская обл., Подольский р-н, пос. Дубровицы,  
e-mail: natavolkova@inbox.ru;

<sup>2</sup>Российская академия сельскохозяйственных наук,  
117218 г. Москва, ГСП-7, ул. Кржижановского, 15, корп. 2

Поступила в редакцию  
19 августа 2011 года

## AGE DYNAMICS OF SPERMATOGENESIS IN COCKS IN CONNECTION WITH OPTIMIZATION OF BIOENGINEERING MANIPULATION TIME

*E.V. Beloglazova<sup>1</sup>, T.O. Kotova<sup>1</sup>, N.A. Volkova<sup>1</sup>, L.A. Volkova<sup>1</sup>,  
N.A. Zinovieva<sup>1</sup>, L.K. Ernst<sup>2</sup>*

### S u m m a r y

In multiple age cocks at the age of 1 week and 12 months the authors studied the morphological structure of testicle tissue and distribution of spermatogenetic epithelium cells in seminal tubules. It was established, that the optimal age for bioengineering manipulations with sexual cells of cocks testicles is period from 1 to 6 weeks, when generative cells of seminal tubules correspond substantially to the spermatogonium.

#### Научные собрания



**II МЕЖДУНАРОДНАЯ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКАЯ КОНФЕРЕНЦИЯ  
«ПОСТГЕНОМНЫЕ МЕТОДЫ АНАЛИЗА В БИОЛОГИИ,  
ЛАБОРАТОРНОЙ И КЛИНИЧЕСКОЙ МЕДИЦИНЕ: ГЕНОМИКА,  
ПРОТЕОМИКА, БИОИНФОРМАТИКА»  
(14-17 ноября 2011 года, г. Новосибирск)**

**Тематика:** постгеномные методы и молекулярная медицина; геномика и протеомика микроорганизмов; постгеномные технологии в создании и валидации лекарственных соединений; биоинформационные технологии; клеточные технологии и регенеративная медицина.

**Контакты и информация:** info@postgenom.ru, www.postgenom.ru