

**Функциональная морфология тканей**

УДК 636.5:591.463.12:591.8.086.2

doi: 10.15389/agrobiology.2019.4.723rus

**ДИНАМИКА ГИСТОЛОГИЧЕСКОЙ СТРУКТУРЫ СЕМЕННИКОВ  
У ПЕРЕПЕЛОВ (*Coturnix coturnix*) В ПРОЦЕССЕ СПЕРМАТОГЕНЕЗА\*****И.П. НОВГОРОДОВА, Н.А. ВОЛКОВА, А.Н. ВЕТОХ, Л.А. ВОЛКОВА,  
В.А. БАГИРОВ, Н.А. ЗИНОВЬЕВА**

Половые клетки самцов — уникальный объект для генетических и физиологических исследований как биологической основы современного животноводства. Процессы созревания и дифференцировки половых клеток самцов животных и птиц представляют огромный интерес для сравнительной эмбриологии, биологии развития, медицины и биотехнологии. Перспективный вид для таких экспериментальных работ — перепел, которые характеризуются ранней половой зрелостью и коротким периодом генерации. Наиболее интересны стволовые клетки семенников — сперматогонии, которые в настоящее время активно изучаются в связи с тем, что их рассматривают в качестве перспективных мишеней для введения рекомбинантной ДНК с целью получения трансгенных особей. Однако морфология половых клеток самцов домашних птиц в процессе их формирования освещена неполно. В этом исследовании мы впервые подробно описываем гистологические особенности ткани сперматогенного эпителия перепелов, находящихся на разных стадиях сперматогенеза и динамику популяций сперматогенных клеток семенников. Целью работы было выявление возрастных особенностей сперматогенеза, связанных с динамикой развития разных типов клеток эпителиосперматогенного слоя семенных канальцев у перепелов. Для этого у перепелов (*Coturnix coturnix*) эстонской породы исследовали гистологическую структуру семенников в возрасте 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 и 24 нед (по 10 самцов в каждой возрастной группе). Ткань семенников фиксировали в растворе Буэна, дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин. Готовили гистологические срезы толщиной 5–6 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Определяли состав сперматогенных клеток и их соотношение в семенных канальцах. Просматривали не менее 30 семенных канальцев каждого самца. Показано, что диаметр семенных канальцев семенников изменялся в процессе онтогенеза и составил в возрасте 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 и 24 нед соответственно  $42 \pm 1$ ,  $71 \pm 2$ ,  $91 \pm 2$ ,  $117 \pm 2$ ,  $237 \pm 4$ ,  $278 \pm 5$ ,  $282 \pm 7$  и  $291 \pm 6$  мкм. Популяция клеток внутри семенных канальцев была представлена клетками Сертоли и генеративными клетками (сперматогонии, сперматоциты, сперматиды и спермии) на разных стадиях дифференцировки в зависимости от возраста. Их общее число в семенных канальцах достоверно увеличивалось с возрастом (соответственно  $18 \pm 1$ ,  $24 \pm 1$ ,  $58 \pm 4$ ,  $80 \pm 6$ ,  $249 \pm 16$ ,  $587 \pm 34$ ,  $658 \pm 24$  и  $540 \pm 41$  в возрасте 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 и 24 нед;  $p < 0,01$ ). В возрасте 1 нед в семенных канальцах перепелов выявлялись единичные клетки Сертоли (среднее число в одном семенном канальце  $12,0 \pm 0,9$ ), в то время как сперматогонии были представлены единичными клетками (от 1 до 4). Максимальный процент сперматогониев от общего числа сперматогенных клеток ( $76 \pm 2$  %) отмечали в возрасте 3 нед. У 4-недельных самцов в семенных канальцах визуализировались сперматоциты 1-го и 2-го порядка, а с 5-недельного возраста — сперматиды. В возрасте 5 нед в семенных канальцах перепелов выявлялись единичные спермии, число которых увеличивалось к 6 нед. Таким образом, у перепелов возраст от 1 до 3 нед — это оптимальный период для манипуляций со сперматогониями при их использовании в качестве биологического материала для сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственной птицы в условиях криобанков, а также как мишеней для введения рекомбинантной ДНК с целью генетической модификации половых клеток самцов и последующего получения трансгенного потомства.

**Ключевые слова:** перепел, семенники, клетки Сертоли, сперматогенез, сперматогонии.

Изучение процессов созревания и дифференцировки половых клеток самцов животных и птиц представляет огромный интерес для сравнительной эмбриологии, биологии развития, медицины и биотехнологии в целом. В особенности это касается сперматогониев как предшественников зрелых половых клеток — спермиев. Сперматогонии рассматриваются в качестве перспективных мишеней для введения рекомбинантной ДНК с целью получения трансгенных особей (1). Такая технология предусматривает выделение и трансформацию *in vitro* сперматогониев с их последующей трансплантацией в семенники самцов-реципиентов, у которых предвари-

\* Работа выполнена при финансовой поддержке РФ, грант № 16-16-04104.

тельно блокируют собственный сперматогенез (2, 3). Трансплантированные сперматогонии впоследствии дифференцируются в спермии, которые используют для получения трансгенного потомства. Подобная возможность получения химерных и генетически модифицированных особей показана в ряде работ на лабораторных животных (4, 5), свиньях (6, 7), овцах (8), а также на петухах (9, 10). Клетки гонад самцов также служат ценным генетическим материалом для создания криобанков в рамках сохранения и поддержания генофонда ценных пород животных и птицы (11, 12).

В отличие от млекопитающих, у птиц, в том числе перепелов, семенники остаются в брюшной полости (на месте их развития) в течение всей жизни (13, 14). Особенности половых органов кур, индеек, уток и перепелов достаточно глубоко описаны с точки зрения анатомии, в то время как морфология клеток самцов домашней птицы освещена неполно (15).

У птиц, как и у млекопитающих, сперматогенез представляет собой длительный процесс постепенной трансформации зародышевых клеток в сперматозоиды в пределах границ семенных канальцев семенника и включает три последовательных этапа — стадии сперматоцитогенеза, сперматидогенеза и спермиогенеза. Физиологические особенности и анатомические характеристики, связанные со сперматогенезом у птиц, составляют предмет обширных исследований (16, 17). При сперматогенезе происходит клеточная пролиферация с повторными митотическими делениями, дублированием хромосом, мейотическим делением клеток и т.д. для дальнейшего образования гаплоидных сперматид с их последующей дифференциацией в зрелые спермии (18).

В представленной работе мы впервые подробно изучили гистологические особенности ткани сперматогенного эпителия перепелов на разных стадиях сперматогенеза и охарактеризовали популяции сперматогенных клеток семенников в динамике.

Нашей целью было изучение возрастных особенностей сперматогенеза у перепелов в связи с динамикой развития разных типов клеток эпителио-сперматогенного слоя семенных канальцев.

**Методика.** В экспериментах использовали самцов перепелов (*Coturnix coturnix*) эстонской породы в возрасте 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 и 24 нед (группы по восьми возрастным категориям, в каждой группе по 10 гол.). Биоматериалом служили семенники, полученные при убое.

Отобранные ткани семенников фиксировали в течение 48 ч в растворе Буэна, состоящем их пикриновой, уксусной кислот и формалина в соотношении 15:1:5, после чего образцы заливали в парафин и готовили гистологические срезы толщиной 5-6 мкм (12, 13). Препараты окрашивали гематоксилином и эозином («BioVitrum», Россия).

При проведении гистологического анализа просматривали семенные канальцы, имеющие округлую форму и просвет (поперечный срез). Типы клеток сперматогенного эпителия идентифицировали по морфологическим характеристикам (14, 15). Гистологические препараты изучали методом световой микроскопии (Ni-U, «Nikon», Япония; микроскоп оснащен пакетом программ для обработки и анализ изображений NIS-Elements, «Nikon», Япония). Оценивали диаметр семенных канальцев, число и состав находящихся в них сперматогенных клеток.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета для анализа данных MS Excel 2016 (t-test). В таблицах представлены средние арифметические значения ( $M$ ) и ошибки средних ( $\pm SEM$ ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0,01$ .

**Результаты.** Гистологическая структура семенников у перепелов

была аналогична таковой у млекопитающих. Паренхиматозную ткань органа формировала система извитых семенных канальцев, содержащих разные типы клеток (клетки Сертоли, сперматогонии, сперматоциты, сперматиды и спермий).

Размер семенных канальцев у перепелов изменялся в течение онтогенеза (табл. 1). В ранний период постнатального развития этот показатель с возрастом незначительно повышался. В период от 1 до 2 нед диаметр семенных канальцев возрастал на 69 % ( $p < 0,01$ ), со 2-й по 3-ю нед — на 28 % ( $p < 0,01$ ), с 3-й по 4-ю нед — на 29 % ( $p < 0,01$ ). Значительный рост размеров семенных канальцев отмечали с 4-й до 5-й нед. Диаметр и площадь семенных канальцев у 5-недельных перепелов были в 2 раза больше аналогичных показателей, установленных для особей в возрасте 4 нед. С 6-й до 24-й нед размеры семенных канальцев практически не изменялись.

### 1. Возрастная динамика морфологических показателей, характеризующих гистоструктуру семенника у перепелов (*Coturnix coturnix*) эстонской породы ( $n = 80$ , $M \pm SEM$ )

Возраст, нед	Диаметр семенных канальцев, мкм	Площадь семенных канальцев, мкм <sup>2</sup>	Число сперматогенных клеток на семенной каналец, шт.
1	42±1	1329±55	18±1
2	71±2 <sup>ab</sup>	4117±222 <sup>ab</sup>	24±1 <sup>ab</sup>
3	91±2 <sup>ab</sup>	6172±177 <sup>ab</sup>	58±4 <sup>ab</sup>
4	117±2 <sup>ab</sup>	9932±310 <sup>ab</sup>	80±6 <sup>ab</sup>
5	237±4 <sup>ab</sup>	40688±993 <sup>ab</sup>	249±16 <sup>ab</sup>
6	278±5 <sup>ab</sup>	56232±868 <sup>ab</sup>	587±34 <sup>ab</sup>
12	282±7 <sup>ac</sup>	57023±766 <sup>ac</sup>	598±23 <sup>ac</sup>
24	291±6 <sup>ac</sup>	55985±812 <sup>ac</sup>	570±41 <sup>ac</sup>

a, b Различия по отношению к предыдущей возрастной группе статистически значимы при  $p < 0,01$ .

a, c Различия по отношению к аналогичному показателю, установленному в возрасте 1 нед, статистически значимы при  $p < 0,01$ .

Увеличение диаметра и площади семенных канальцев у перепелов с возрастом было обусловлено ростом и дифференцировкой сперматогенных клеток (табл. 1). У 1-недельных самцов число сперматогенных клеток в одном семенном канальце варьировало от 11 до 26 и составило в среднем  $18 \pm 1$ . На 2-й нед этот показатель возрастал по отношению к значениям, установленным у 1-недельных особей, на 33 % ( $p < 0,01$ ), в период с 2 до 3 нед — на 142 % ( $p < 0,01$ ), с 3 до 4 нед — на 86 % ( $p < 0,01$ ). Значительный рост и дифференцировка сперматогенных клеток отмечались с 4-й до 6-й нед. В семенных канальцах 5-недельных самцов по сравнению с 4-недельными число сперматогенных клеток увеличивалось в 3,1 раза, с 5-й до 6-й нед — 2-кратно. После достижения половозрелости (6 нед) рост и развитие самцов практически не сопровождалось изменениями в числе сперматогенных клеток в семенных канальцах семенников. Различия в этом показателе, установленном на 6-й нед и в более позднем возрасте (3 и 6 мес), не превышали 1,8 %.

Наличие, число и соотношение сперматогенных клеток внутри семенных канальцев семенников варьировали в зависимости от возраста перепелов (табл. 2). У 1-недельных перепелов базальную мембрану семенных канальцев семенников выстилали клетки Сертоли и единичные сперматогонии (рис. 1, А), при этом по числу клетки Сертоли преобладали с процентным соотношением соответственно 71 % против 29 %. Клетки Сертоли имели темноокрашенное ядро пирамидальной формы, расположенное на базальной мембране. Сперматогонии располагались по семенному каналцу и не встречались на базальной мембране, были представлены преимущественно типом А (стволовые клетки семенника). Клетки этого типа были крупными и характеризовались наличием ядра эллиптической

или округлой формы, расположенного, как правило, на базальной мембране канальца. Ядерный хроматин в ядре концентрировался в одной зоне.

## 2. Состав популяции клеток сперматогенного эпителия в семенных канальцах семенников разновозрастных перепелов (*Coturnix coturnix*) эстонской породы ( $n = 80$ , $M \pm SEM$ )

Возраст перепелов, нед	Тип клеток				
	клетки Сертоли	сперматогонии	сперматоциты 1-го порядка	сперматоциты 2-го порядка	сперматиды
1	12±1	5±1	0	0	0
2	13±1	10±1 <sup>ab</sup>	0	0	0
3	15±1	44±4 <sup>ab</sup>	0	—	0
4	14±1	49±3	11±1	5±1	0
5	16±1	92±5 <sup>ab</sup>	21±3 <sup>ab</sup>	25±3 <sup>ab</sup>	96±13
6	16±1	112±4 <sup>ab</sup>	61±5 <sup>ab</sup>	84±2 <sup>ab</sup>	192±3 <sup>ab</sup>
3	18±3	113±9	65±5	95±8	194±5
6	18±2	119±6	63±4	93±4	192±3
12	12±1	5±1	0	0	0
24	13±1	10±1 <sup>ab</sup>	0	0	0

a, b Различия по отношению к предыдущей возрастной группе статистически значимы при  $p < 0,01$ .

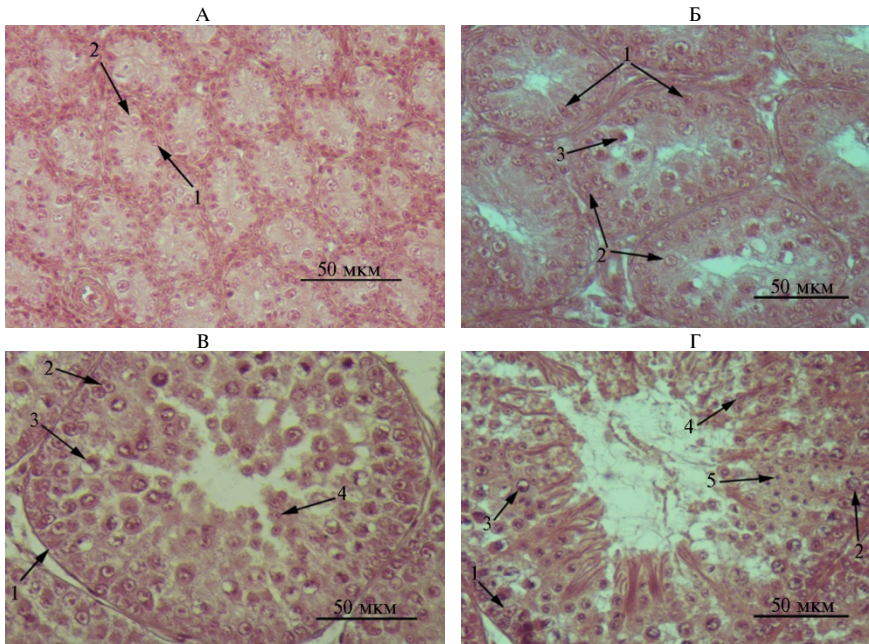


Рис. 1. Гистологическая структура семенных канальцев семенников перепелов (*Coturnix coturnix*) эстонской породы в возрасте 1 нед (А), 3 нед (Б), 4 нед (В) и 6 нед (Г): 1 — клетки Сертоли, 2 — сперматогонии, 3 — сперматоциты 1-го порядка, 4 — сперматоциты 2-го порядка, 5 — сперматиды. Окрашивание гематоксилином и эозином, световая микроскопия (Ni-U, «Nikon», Япония), увеличение  $\times 400$ .

У 2-недельных перепелов клетки сперматогенного эпителия семенных канальцев также были представлены двумя типами — клетками Сертоли и сперматогониями. Число сперматогониев разных типов в семенном канальце увеличивалось до  $10 \pm 1$  ( $p < 0,01$ ). При этом число клеток Сертоли изменялось незначительно (см. табл. 2). Сперматогонии встречались как на периферии, так и внутри семенного канальца. Наряду со сперматогониями типа А выявлялись сперматогонии промежуточного типа и типа В. Сперматогонии промежуточного типа были чуть меньше сперматогониев типа А, хроматин в их ядре сливался в одно или два ядрышка и имел более темный цвет. Сперматогонии типа В характеризовались наличием большого ядра круглой или эллиптической формы, хлопья хроматина в

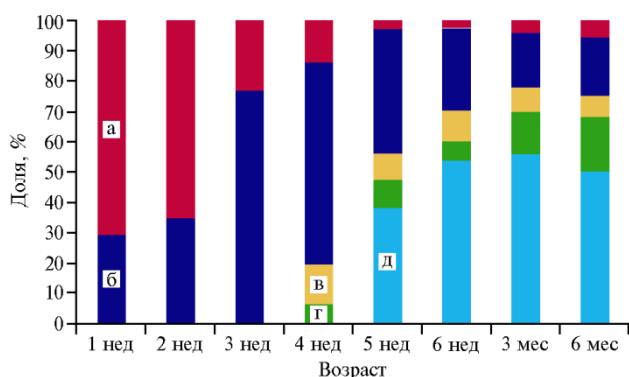
ядре распределялись по всей эндоплазме. На указанной стадии развития просвет семенного канальца отсутствовал.

Формирование в семенных канальцах просвета, необходимого для выхода спермиев у взрослых особей, отмечали в возрасте 3 нед (см. рис. 1, Б). Сперматогонии располагались на базальной мембране. Их число по сравнению с предыдущим периодом увеличилось в 4,4 раза ( $p < 0,01$ ).

В возрасте 4 нед небольшие формирующиеся просветы имелись во всех семенных канальцах. В некоторых из них клетки сперматогенного эпителия выстраивались в 5-6 рядов. Наряду с клетками Сертоли и сперматогониями выявлялись сперматоциты 1-го и 2-го порядка, которые располагались ближе к центру канальца. Сперматоциты 1-го порядка представляли собой большие клетки с крупным овальным ядром. Сперматоциты 2-го порядка были меньше по размеру (см. рис. 1, В). Среднее число сперматоцитов 1-го и 2-го порядка в семенном канальце не превышало соответственно  $11 \pm 1$  и  $5 \pm 1$ . Число клеток Сертоли и сперматогониев в этом возрасте по сравнению с предыдущим периодом заметно не изменялось: различия по показателям не превышали соответственно 6 и 13 %.

У 5-недельных особей популяция сперматогенных клеток в семенных канальцах была представлена клетками Сертоли, сперматогониями, находящимися на базальной мембране, сперматоцитами 1-го и 2-го порядка (см. табл. 2). Вблизи просвета отмечали наличие сперматид в виде незрелых мелких образований округлой формы с отчетливо видимым ядром. В просвете некоторых семенных канальцев появлялись единичные сперматозоиды.

К 6-недельному возрасту ближе к просвету семенного канальца выявлялись сперматиды удлинённой формы с хвостиками, их число по сравнению с предыдущим периодом увеличивалось в 2,0 раза ( $p < 0,01$ , см. табл. 2, рис. 1, Г). Отмечалось наличие сперматид на разных этапах спермиогенеза,



**Рис. 2.** Соотношение клеток сперматогенного эпителия семенных канальцев в семенниках разновозрастных перепелов (*Coturnix coturnix*) эстонской породы: а — клетки Сертоли, б — сперматогонии, в — сперматоциты 1-го порядка, г — сперматоциты 2-го порядка, д — сперматиды.

что обусловило их неодинаковую форму. Так, с приближением к просвету семенных канальцев сперматиды уменьшались в размере и представляли собой клетки с овальной удлинённой головкой темного цвета и длинными хвостиками. В единичных семенных канальцах встречались сперматиды, располагающиеся пучками. В просветах большинства семенных канальцев выявлялись сформировавшиеся

сперматозоиды. Клетки Сертоли зачастую имели вытянутую форму (в виде тяжей, располагающихся практически от базальной мембраны до просвета канальца). Общее число клеток в семенных канальцах по сравнению с аналогичным показателем в возрасте 5 нед повышалось в 2,4 раза, преимущественно за счет увеличения числа сперматоцитов, сперматид и спермиев ( $p < 0,01$ ).

У взрослых самцов в возрасте 3 и 6 мес в семенных канальцах присутствовали все клетки сперматогенного эпителия; средние значения этих

показателей были практически одинаковыми. Различия по содержанию в семенных канальцах сперматогенных клеток разных типов, установленные у перепелов в 6-недельном возрасте и в 3 и 6 мес, не превышали 11 %.

Таким образом, проведенные исследования показали, что у разновозрастных перепелов число разных типов сперматогенных клеток и их соотношение в семенных канальцах семенников варьировали. Доля клеток Сертоли от общего числа сперматогенных клеток в семенном канальце с возрастом снижалась за счет относительного содержания сперматоцитов и сперматид (рис. 2). В ранний период постнатального развития самцов доля сперматогониев повышалась по мере взросления особи, достигая максимального значения (до 76,6 %) к 3-недельному возрасту. В последующий период этот показатель снижался до 13 % в возрасте 6 мес.

Результаты настоящего исследования согласуются с данными, полученными нами ранее при изучении возрастных особенностей сперматогенеза у кроликов (19), петухов (20), цесарей (21). У самцов перечисленных видов показано изменение состава сперматогенных клеток в семенных канальцах семенников в онтогенезе. В течение постнатального периода отмечалась неравномерность в увеличении размеров семенных канальцев, разница по наличию, числу и соотношению сперматогенных клеток в них. В ранний период онтогенеза размеры семенных канальцев и число сперматогенных клеток в них постоянно и существенно возрастали. Интенсивный рост и дифференцировка сперматогенных клеток и, как следствие, увеличение размеров семенных канальцев выявлено в период, предшествующий достижению половозрелости: у самцов кроликов в возрасте от 5 до 6 мес, у петухов и цесарей — от 4 до 5 мес. Отметим, что подобных исследований, выполненных другими авторами, нам обнаружить не удалось.

Среди доступных информационных источников мы также не нашли публикаций, касающихся возрастных изменений морфометрических характеристик семенных канальцев семенников у перепелов и количественного состава сперматогенных клеток. Работы на птице, в том числе перепелах, были связаны преимущественно с изучением морфометрических показателей (диаметр, площадь и др.) сперматогенных клеток и их структурных единиц в процессе дифференцировки (22, 23). Имеется ряд работ других авторов по изучению анатомического строения и морфометрических данных половых органов у самцов перепелов (24-27). Так, была выполнено оценка морфометрических показателей семенников у 60-суточных перепелов, в частности определены размеры семенников, их анатомическое строение и гистологическая структура (24). Представленные в указанной работе результаты гистологических исследований согласуются с полученными нами. Т.А. Kannan с соавт. (25) изучали анатомические и морфологические особенности семенников перепелов в возрастной динамике: у молодых перепелов, по достижении половозрелости и у взрослых самцов. Было показано увеличение размеров семенников до 22-недельного возраста. Аналогичные данные получены К.В. Баусовой (26). В ряде работ отмечается влияние на сперматогенез перепелов различных кормов, гормонов, гербицидов и других веществ (28-30), а также естественного и искусственного освещения (31).

Итак, у перепелов (*Coturnix coturnix*) размер семенных канальцев, число и состав сперматогенных клеток в них варьирует в зависимости от возраста. В возрасте 1-3 нед популяция клеток эпителио-сперматогенного слоя семенных канальцев представлена двумя типами — клетками Сертоли и сперматогониями. У 3-недельных особей начинает формироваться се-

менной просвет, с 4-й нед на гистологических срезах семенников выявляются сперматоциты 1-го и 2-го порядка, а с 5-й нед — сперматиды. В семенных канальцах 6-недельных перепелов присутствуют все типы клеток эпителио-сперматогенного слоя: клетки Сертоли, сперматогонии разных типов, сперматоциты 1-го и 2-го порядка, сперматиды, спермии. Эти данные расширяют представления о морфологии формирующихся половых клеток у самцов домашней птицы и позволяют заключить, что у перепелов возраст от 1 до 3 нед — это оптимальный период для манипуляций со сперматогониями при их использовании в качестве биологического материала для сохранения генетических ресурсов сельскохозяйственной птицы в условиях криобанков, а также как мишеней для введения генных конструкций с целью получения трансгенной птицы.

## ЛИТЕРАТУРА

- Olive V., Cuzin F. The spermatogonial stem cell: from basic knowledge to transgenic technology. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2005, 37: 246-250 (doi: 10.1016/j.biocel.2004.07.017.)
- Takashima S. Biology and manipulation technologies of male germline stem cells in mammals. *Reproductive Medicine and Biology*, 2018, 17(4): 398-406 (doi: 10.1002/rmb2.12220).
- Sofikitis N., Kaponis A., Mio Y., Makredimas D., Giannakis D., Yamamoto Y., Kanakas N., Kawamura H., Georgiou J., Schrader M., Lolis E., Giannakopoulos X., Loutradis D., Tarlatzis V., Miyagawa I. Germ cell transplantation: a review and progress report on ICSI from spermatozoa generated in xenogeneic testes. *Human Reproduction Update*, 2003, 9(3): 291-307 (doi: 10.1093/humupd/dmg015).
- Dobrinski I., Avarbock M.R., Brinster R.L. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes. *Molecular Reproduction and Development*, 2000, 57: 270-279 (doi: 10.1095/biolreprod66.1.21).
- Brinster R.L. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*, 2002, 296: 2174-2176 (doi: 10.1126/science.1071607).
- Honaramooz A.I., Megee S.O., Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs. *Biology of Reproduction*, 2002, 66(1): 21-28 (doi: 10.1095/biolreprod66.1.21).
- Savchenkova I.P., Korjikova S.V., Kostereva N.V., Ernst L.K. Cultivation and transfer of porcine type A spermatogonia. *Russian Journal of Developmental Biology*, 2006, 37(4): 242-249 (doi: 10.1134/S1062360406040060).
- Rodriguez-Sosa J.R., Dobson H., Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenology*, 2006, 66: 2091-2103 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.03.039).
- Yu F., Ding L.J., Sun G.B., Sun P.X., He X.H., Ni L.G., Li B.C. Transgenic sperm produced by electrotransfection and allogeneic transplantation of chicken fetal spermatogonial stem cells. *Molecular Reproduction and Development*, 2010, 77: 340-347 (doi: 10.1002/mrd.21147).
- Li B., Sun G., Sun H., Xu Q., Gao B., Zhou G., Zhau W., Wu X., Bao W., Yu F., Wang K., Chen G. Efficient generation of transgenic chickens using the SSCs in vivo and ex vivo transfection. *Science China Life Sciences*, 2008, 51: 734-742 (doi: 10.1007/s11427-008-0100-2).
- Zheng Y., Zhang Y., Qu R., He Y., Tian X., Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*, 2014, 147: 65-74 (doi: 10.1530/REP-13-0466).
- Nakamura Y., Usui F., Miyahara D., Mori T., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., Tagami T. Efficient system for preservation and regeneration of genetic resources in chicken: concurrent storage of primordial germ cells and live animals from early embryos of a rare indigenous fowl (Gifujidori). *Reproduction Fertility Development*, 2010, 22: 1237-1246 (doi: 10.1071/RD10056).
- Deviche P., Hurley L.L., Fokidis H.B. Function, avian testicular structure and regulation. In: *Hormones and Reproduction of Vertebrates* /D. Norris, K. H. Lopez (eds.). Elsevier Inc., 2011: 27-70 (doi: 10.1016/B978-0-12-374929-1.10002-2).
- Wei L., Peng K.-M., Liu H., Song H., Wang Y., Tang L. Histological examination of testicular cell development and apoptosis in the ostrich chick. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 2011, 35(1): 7-14 (doi: 10.3906/vet-0806-2).
- Thurston R.J., Korn N. Spermiogenesis in commercial poultry species: anatomy and control. *Poultry Science*, 2000, 79: 1650-1668 (doi: 10.1093/ps/79.11.1650).
- Aire T.A., Ozegebe P.C. The testicular capsule and peritubular tissue of birds: morphometry, histology, ultrastructure and immunohistochemistry. *Journal of Anatomy*, 2007, 210: 731-740 (doi: 10.1111/j.1469-7580.2007.00726.x).

17. Jamieson B.G.M. Avian spermatozoa: structure and phylogeny. In: *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds* /B.G.M. Jamieson (ed.). Science Publishers, Enfield, New Hampshire, U.S.A. Jersey, Plymouth, U.K., 2007: 349-511.
18. Perucetti R.L., Taboga S.R., Vilela de Azeredo-Oliveira M.T. Morphological changes of mammalian nucleoli during spermatogenesis and their possible role in the chromatoid body assembling. *International Scholarly Research Notices. Cell Biology*, 2012, 2012: Article ID 829854 (doi: 10.5402/2012/829854).
19. Ендовицкая И.П., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Динамика сперматогенеза у кролика *Oryctolagus cuniculus*. *Цитология*, 2005, 47(1): 44-48.
20. Белоглазова Е.В., Котова Т.О., Волкова Н.А., Волкова Л.А., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Возрастная динамика сперматогенеза у петухов в связи с оптимизацией сроков биоинженерных манипуляций. *Сельскохозяйственная биология*, 2011, 6: 60-64.
21. Volkova N.A., Vetokh A.N., Novgorodova I.P., Dotsev A.V., Zinovieva N.A. The dynamics of spermatogenesis in guinea fowls. *Reproduction, Fertility and Development*, 2017, 30(1): 211-211 (doi: 10.1071/RDv30n1Ab143).
22. Abdul-Rahman I., Obese F.Y., Robinson J.E. Spermatogenesis and cellular associations in the seminiferous epithelium of Guinea cock (*Numida meleagris*). *Canadian Journal of Animal Science*, 2017, 97(2): 241-249 (doi: 10.1139/cjas-2016-0068).
23. Aire T.A. Spermatogenesis in birds. *Spermatogenesis*, 2014, 4(3): e959392 (doi: 10.4161/21565554.2014.959392).
24. Савельева А.Ю. Микроскопическое строение половых желез домашнего японского перепела. *Международный научно-исследовательский журнал*, 2016, 4(46): 59-62 (doi: 10.18454/IRJ.2016.46.165).
25. Kannan T.A., Ramesh G., Sivakumar M. Age related changes in the gross and histoarchitecture of testis in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*). *International Journal of Livestock Research*, 2015, 5(6): 26-33 (doi: 10.5455/ijlr.20150614083747).
26. Баусова К.В. Постынкубационный онтогенез семенников эстонского перепела. *Птицеводство*, 2016, 8: 48-52.
27. Kouatcho F.D., Kenfack A., Ngoula F., Tegua A. Sexual maturity prediction based on hormonal profiles, testes and semen characteristics in male *Coturnix* quail (Garsault, 1764) in the Western Highlands of Cameroon. *International Journal of Agronomy and Agricultural Research (IJAR)*, 2015, 7(4): 143-154.
28. Bello U.M., Madekurozwa M.-C., Groenewald H.B., Aire T.A., Arukwe A. The effects on steroidogenesis and histopathology of adult male Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) testis following pre-pubertal exposure to di(n-butyl) phthalate (DBP). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2014, 166: 24-33 (doi: 10.1016/j.cbpc.2014.06.005).
29. Hussain R., Khan A., Mahmood F., Rehan S., Ali F. Clinico-hematological and tissue changes induced by butachlor in male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2014, 109: 58-63 (doi: 10.1016/j.pestbp.2014.01.005).
30. Türk G., Simsek U.G., Çeribası A.O., Çeribası S., Kaya S.O., Güvenç M., Çiftçi M., Sönmez M., Yüce A., Bayraktar A., Yaman M., Tonbak F. Effect of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) bark oil on heat stress-induced changes in sperm production, testicular lipid peroxidation, testicular apoptosis, and androgenic receptor density in developing Japanese quails. *Theriogenology*, 2015, 84: 365-376 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2015.03.035).
31. Yadav S., Chaturved C.M. Light colour and intensity alters reproductive/seasonal responses in Japanese quail. *Physiology & Behavior*, 2015, 147: 163-168 (doi: 10.1016/j.physbeh.2015.04.036).

ФГБНУ Федеральный научный центр животноводства — Поступила в редакцию  
**ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,** 5 декабря 2018 года  
 142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,  
 e-mail: novg-inna2005@yandex.ru ✉, natavolkova@inbox.ru,  
 anastezuya@mail.ru, ludavolkova@inbox.ru, vugarbagirov@mail.ru,  
 n\_zinovieva@mail.ru

*Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2019, V. 54, № 4, pp. 723-731

## TESTIS HISTOSTRUCTURE DYNAMICS DURING QUAIL (*Coturnix coturnix*) SPERMATOGENESIS

I.P. Novgorodova, N.A. Volkova, A.N. Vetokh, L.A. Volkova, V.A. Bagirov,  
 N.A. Zinovieva

Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail novg-inna2005@yandex.ru ✉ corresponding author), natavolkova@inbox.ru, anastezuya@mail.ru, ludavolkova@inbox.ru, vugarbagirov@mail.ru, n\_zinovieva@mail.ru



ORCID:

Novgorodova I.P. orcid.org/0000-0002-4617-1644

Volkova N.A. orcid.org/0000-0001-7191-3550

Vetokh A.N. orcid.org/0000-0002-2865-5960

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation, grant No. 16-16-04104

Received December 5, 2018

Volkova L.A. orcid.org/0000-0002-9407-3686

Bagirov V.A. orcid.org/0000-0001-8385-2433

Zinovieva N.A. orcid.org/0000-0003-4017-6863

doi: 10.15389/agrobiology.2019.4.723eng

## Abstract

Male sex cells are unique objects for scientific research in the field of genetics and physiology and in the study of the development biological basis in animal husbandry. Maturation and differentiation processes in male animals and birds germ cells are of great interest for comparative embryology, developmental biology, medicine and biotechnology. Quails characterized by early puberty and a short generation period are perspective for these experimental works. The greatest interest is the use of spermatogonia, the testes stem cells which are currently being actively studied as promising targets for the introduction of recombinant DNA in obtaining transgenic individuals. However, the morphology of germ cells from male poultry in their formation process is not fully covered. For the first time, we describe in detail the histological features of spermatogenous quail epithelium tissue at different stages of spermatogenesis and the dynamics of spermatogenous testis cells populations in this study. The aim of the study was to identify age-related features of spermatogenesis associated with the dynamics of the different cell type development in the epithelial spermatogenous layer of the seminiferous tubules in quail. For this, we examined the histological structure of the testes in quail (*Coturnix coturnix*) of the Estonian breed at the age of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12, and 24 weeks. In each age group, there were 10 males. Testis tissue was fixed in Bouin's solution, dehydrated in alcohols of increasing concentration and embedded in paraffin. Five to six micron histological sections were stained with hematoxylin-eosin. The composition of spermatogenic cells and their ratio in the seminiferous tubules was investigated. At least 30 seminiferous tubules were examined from each male. The diameter of the seminiferous tubules in the quail testes changed during ontogenesis and at the age of 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 and 24 weeks reaching  $42 \pm 1$ ,  $71 \pm 2$ ,  $91 \pm 2$ ,  $117 \pm 2$ ,  $237 \pm 4$ ,  $278 \pm 5$ ,  $28 \pm 7$  and  $291 \pm 6$   $\mu\text{m}$ , respectively. Sertoli cells and generative cells were parts of cell population of the quail seminiferous tubules at different stages of differentiation, i.e. spermatogonia, spermatocytes, spermatids and sperm cell maturation. The number of spermatogenic cells inside the seminiferous tubules increased with age ( $p < 0.01$ ) and was  $18 \pm 1$ ,  $24 \pm 1$ ,  $58 \pm 4$ ,  $80 \pm 6$ ,  $249 \pm 16$ ,  $587 \pm 34$ ,  $658 \pm 24$  and  $540 \pm 41$  in quails aged 1, 2, 3, 4, 5, 6, 12 and 24 weeks, respectively. In 1-week aged quails, Sertoli cells dominate in seminiferous tubules ( $12 \pm 1$  per seminiferous tubule) while spermatogonia are few, 1 to 4 cells per tubule. The number of spermatogonia increases with age. The percentage of spermatogonia is maximum in 3-week aged birds,  $76 \pm 2$  % of the total number of spermatogenic cells. In 4-week aged quails, primary and secondary spermatocytes are visualized in the seminiferous tubules, and from week 5 spermatids are found. At the age of 5 weeks, we detected single spermatozoa, the number of which increased in the quail semen tubules by the 6-week age. Thus, the quails' age from 1 to 3 weeks is optimal for manipulating spermatogonia as targets for introducing recombinant DNA in order to obtain transgenic offspring or biological material to preserve the genetic resources of farm birds in cryobanks.

Keywords: quail, testes, Sertoli cells, spermatogenesis, spermatogonia.

Адрес сайта журнала в Интернете — [www.agrobiology.ru](http://www.agrobiology.ru)  
Статьи, события, информация — 10500 просмотров за месяц

Российская академия сельскохозяйственных наук  
Научно-теоретический журнал

Сельскохозяйственная **БИОЛОГИЯ**  
основан в 1966 году

НОВОСТИ

УСЛУГИ  
РЕКВИЗИТЫ  
ПОДПИСКА

ПАРТНЕРЫ  
АВТОРЫ

КНИГИ  
СОБЫТИЯ

АНОНС  
АРХИВ

О ЖУРНАЛЕ  
РЕДСОВЕТ  
ПРАВИЛА

РУС ENG

поиск

**КАРТА САЙТА**

Включен в Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий в Российской Федерации, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени доктора и кандидата наук (Перечень ВАК) (по агрономии и лесному хозяйству, по зоотехническим и ветеринарным специальностям, а с 2007 года — также по биологическим наукам).

- В разделе "Архив" нашего сайта в открытом доступе представлены полнотекстовые версии статей с 2007 года.
- С 2010 года на нашем сайте размещаются англоязычные полнотекстовые версии основной части экспериментальных статей.