

МЕЙОТИЧНІ ХРОМОСОМИ ЕЯКУЛЬОВАНИХ СПЕРМАТОЦИТІВ БУГАЇВ

В. В. ДЗІЦЮК

*Інститут розведення і генетики тварин імені М.В.Зубця НААН(Чубинське, Україна)
dzitsiuk@yandex.ua*

Досліджена частота і морфологічна структура мейоцитів в еякулятах бугаїв. Порівняльний аналіз хромосом із еякульованих мейоцитів і мейотичних хромосом на препаратах, отриманих із сім'яників, не виявив різниці в морфології. В еякулятах ідентифіковані клітини, що перебувають на різних стадіях профазі I мейозу до метафази I включно. Хромосоми еякульованих мейоцитів можуть бути використані для цитологічної діагностики мейотичних аномалій у бугаїв-плідників.

Ключові слова: мейоцити, еякуляти, мейоз, хромосоми, сперматоцити

THE MEIOTIC CHROMOSOMES OF THE BULL EJACULATED SPERMATOCYTES

V. V. Dzitsiuk

*Institute of Animal Breeding and Genetics nd. a. M.V.Zubets NAAS (Chubynske, Ukraine)
dzitsiuk@yandex.ua*

The frequency and morphological structure of meiocytes in bull semen were investigated. Comparative analysis of chromosomes of ejaculated eyakulovanyh meiyotsytiv and meiotic chromosomes in preparations obtained from testis, found no difference in morphology. Thr identified in the ejaculate at different stages of meiotic prophase and metaphase to and inclusive cells. Chromosomes of ejaculate meiocytes can be used for cytological diagnosis of meiotic abnormalities in sires.

Key words: meiocytes, ejaculate, meiosis, chromosomes, spermatocytes

МЕЙОТИЧЕСКИЕ ХРОМОСОМЫ ЭЯКУЛИРОВАННЫХ СПЕРМАТОЦИТОВ БЫКОВ

В. В. Дзицюк

*Інститут розведення і генетики животнох імені М.В. Зубця НААН (Чубинське, Україна)
dzitsiuk@yandex.ua*

Исследована частота встречаемости и морфологическая структура мейоцитов в эякулятах быков. Сравнительный анализ хромосом из эякулированных мейоцитов и мейотических хромосом на препаратах, полученных из семенников, не выявил разницы в морфологии. В эякулятах идентифицированы клетки на разных стадиях профазы I мейоза до метафазы I включительно. Хромосомы эякулированных мейоцитов могут быть использованы для цитологической диагностики мейотических аномалий у быков-производителей.

Ключевые слова: мейоциты, эякуляты, мейоз, хромосомы, сперматоциты

Вступ. Традиційно мейотичні хромосоми ссавців досліджують в біопсійному матеріалі чи в матеріалі, отриманому після кастрації або забою тварин. Однак відбір матеріалу для досліджень пункцією сім'яника призводить до стресової ситуації у тварин, утворення гематом і, як наслідок, до погіршення їх спермопродуктивності. Це доцільно практикувати

лише в особливих випадках для дослідження рідкісних видів тварин, для масового цитогенетичного моніторингу плідників на племінних підприємствах такий спосіб відбору біологічного матеріалу непридатний.

Багатообіцяючим є підхід, який дає можливість обійти цю проблему – цитологічний аналіз може бути проведений на еякульованих мейоцитах. Відомо, що в еякулятах тварин, окрім сперматозоїдів, зустрічаються статеві клітини, які перебувають на різних стадіях сперматогенезу, і внаслідок якихось причин еякулювали. Вперше було звернено увагу на наявність в еякуляті незрілих статевих клітин в статтях Templado C. et al. [16], де йшлося про підходи до вивчення причин появи цих клітин в еякуляті і значення цього. Метод поки що не отримав широкого розповсюдження і обмежено використовується лише в клініках для вивчення причин безплідності чоловіків.

Дослідження можливості використання цього методу для аналізу мейотичних хромосом є метою нашої роботи.

Матеріали та методи досліджень. Для досліджень отримали еякуляти бугаїв-плідників симентальської породи з ПОП «Дружба» Чернігівської області.

Препарати хромосом із незрілих клітин з еякуляту готували за методом Темпладо [18] з урахуванням особливостей еякулятів бугаїв. Для цього 0,5 мл еякуляту вносили в центрифужну пробірку з гіпотонічним розчином (0,038 М розчин KCl), інкубували при 38°C протягом 30 хв., центрифугували (10 хв при 300 g), осад ресуспендували охолодженим метанол–оцтовим фіксатором (3:1). Після трикратної зміни фіксатора з проміжним центрифугуванням (10–15 хв. при 300g) до осаду добавляли 5 мл фіксатора і отриману суспензію наносили на предметні скельця. Препарати фарбували за Гімза і аналізували за допомогою світлового мікроскопу PZO при збільшенні в 1000 разів.

Результати досліджень і їх обговорення. В усіх еякулятах досліджених бугаїв були виявлені клітини сперматогенного ряду, причому спостерігалась індивідуальна мінливість за їх відносною кількістю (табл.).

Число клітин мейотичного ряду в еякулятах бугаїв

| Кличка бугая | Концентрація сперми, млрд/мл | Рухливість спермійв, балів | Частка клітин від числа спермійв, % | Число клітин на різних стадіях сперматогенезу, % від загальної кількості мейоцитів | | | |
|------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------------|--|-------------------|-------------|--------------|
| | | | | лепто-тена | зиготена-пахітена | інші стадії | не визначені |
| Красавчик 5061 | 1,2±0,7 | 8±2,1 | 0,00001±0,1 | 2,0±1,6 | 10,0±2,1 | 45,0±2,8 | 43,0±3,2 |
| Александрій 2045 | 1,0±0,5 | 8±2,0 | 0,0008±0,1 | 3,0±1,7 | 11,0±1,9 | 34,0±2,5 | 52,0±2,4 |
| Фант 39032/385 | 0,8±0,8 | 7±1,5 | 3,8±0,5 | 2,5±2,0 | 16,0±1,6 | 16,5±2,5 | 65,0±2,9 |
| Фараон 73 | 1,0±0,6 | 8±1,6 | 0,0001±0,1 | 2,8±1,6 | 9,0±1,9 | 30,2±2,6 | 58,0±2,3 |

Встановлено, що морфологія незрілих статевих клітин з еякуляту не порушена і відповідає структурним характеристикам хромосом, препарати яких отримані з сім'яника. Частка таких клітин за даними літератури у різних видів різна: у бугая 0,01 % від числа сперматозоїдів [4], у людини – 2,8–4 % [5]. За нашими даними, число клітин сперматогенного ряду в еякулятах досліджених бугаїв не перевищує 0,01 % від числа сперматозоїдів.

Існує думка, що більша кількість незрілих клітин сперматогенного ряду є результатом блоку мейозу на окремій його стадії. Таким способом є можливість вирахувати проблемну зону мейотичного поділу. Іншими словами – наявність більшої кількості мейоцитів певної стадії розвитку і є інформативним показником стадії, на якій відбувся блок мейотичного поділу. Окрім цього, співвідношення клітин, які на різних стадіях мейозу надійшли в еякулят, може бути показником тривалості цих стадій.

Логічно припустити, що саме в результаті блоку однієї із стадій мейозу у плідника виявиться патологія спермопродуктивності, зокрема низька концентрація сперми. Наші дані

показують, що концентрація спермій є інформативним параметром, асоційованим з проявом каріотипу з абераціями. В зв'язку з цим у бугаїв, які мають знижену концентрацію спермій (брак за концентрацією) доцільно обстежити соматичний каріотип.

Цитологічний аналіз еякульованих мейоцитів дозволяє простежити стадію мейозу, де відбувається блокування сперматогенезу у бугая з проблемою низької концентрації сперми і це дає підстави вважати, що концентрація спермій є інформативним параметром, асоційованим з проявом каріотипу з абераціями.

Порушення кон'югації хромосом в зиготені (в т.ч. формування синаптонемного комплексу — структури, необхідної для повноцінної кон'югації гомологічних хромосом), кросинговеру в пахітені, розходження гомологічних хромосом в диплотені призводить до часткового блоку сперматогенезу на ранніх стадіях профазі I мейозу і селекції неповноцінних гамет. Крім того, необхідно відмітити, що при виникненні структурних перебудов хромосом і їх впливу на сперматогенез, можливо, має значення і ефект положення, точкові мутації, міні-делеції і міні-дуплікації в одній чи обох точках розриву, в які можуть бути втягнуті гени, що беруть участь в регуляції тих чи інших етапів сперматогенезу.

Таким чином, блок мейозу може бути на всіх стадіях профазі I мейозу. Зокрема, блок на стадії зиготени проявляється в повній чи частковій втраті здатності до формування вісьових елементів хромосом і СК. На думку С. Ф. Popescu [14.], такі порушення можуть бути проявом мутацій генів, які відповідають за формування білкових вісьових елементів і СК, а можливо і порушенням процесу конденсації хромосом і ДНК-білкових взаємодій.

Дослідження мейотичних хромосом проводять на стадії пізньої профазі (диплотена, діакінез). Нами ідентифіковані сперматогонії, сперматоцити первинні в прелептотені, лептотені, зиготені, пахітені, диплотені, діакінезі — метафазі I (M1).

Найчастіше в досліджених еякулятах бугаїв зустрічались клітини на стадіях лептотени (до 18 %) і пахітени (до 33 %). Ці дані узгоджуються з результатами досліджень клітин сперматогенного ряду в еякуляті людини [6]. Ці стадії є найбільш тривалими. Очевидно, найкоротшими є стадії мейотичного поділу, на яких відбувається формування сперматоцитів, тому нам не вдалось виявити їх ні в одному з еякулятів, які досліджували. Не виявили і клітин на стадіях анафазі I і телофазі I. Як показав Попеску, [14] ці стадії також дуже нетривалі. У окремих плідників виявлено більшу кількість клітин, яких не ідентифікували, що, на нашу думку, вказує на активність дегенеративних процесів в сперматогенному епітелії.

Так у бугая Красавчика 5061 симентальської породи (ПОП «Дружба» Чернігівської області) (таблиця) число незрілих клітин сперматогенного ряду виявилось на порядок нижчим за вищої концентрації сперми, ніж у інших досліджених бугаїв. В той же час у бугая Фанта 39032/385, з концентрацією сперми 800 млн/мл, число клітин сперматогенного ряду було значно більшим – до 3,8 %. В даному випадку невисока концентрація сперми, очевидно, є наслідком блоку мейозу на одній із стадій, як це пояснює Templado et al. [18]. Серед клітин сперматогенного ряду у бугая Фанта 39032/385 частіше, ніж у інших бугаїв, зустрічаються клітини на ранніх стадіях профазі мейозу, що дає підстави зробити припущення про часткове блокування мейозу у цієї тварини на стадії лептотени.

Одним із механізмів, що порушує проходження сперматогенезу є порушення формування синаптонемного комплексу в зиготені і ранній пахітені профазі I мейозу [8]

З даних літератури очевидно, що профазі I мейозу є найбільш чутливою до чинників, які впливають на формування і диференціювання клітин сперматогенного ряду. Поряд з проходженням процесу формування спермій відбувається послідовна презиготична селекція клітин завдяки дії незалежних і притаманних кожній стадії сперматогенезу механізмів блоку розвитку статевих клітин [2].

Хромосомні порушення у клітинах сперматогенного ряду можуть виникати на різних етапах мейотичного ділення. Найчастіше, за даними літературних джерел, виявляються аномалії проходження першого мейотичного поділу.

Вивчення аномалій мейотичних хромосом у людини показало, що найзручнішою для дослідження різних аномалій синапсису і структурних аберацій, тобто для проведення «пахітеного аналізу хромосом», є стадія пахітени [10, 12]. Пахітени хромосоми більш спіралізовані [18].

В досліджених нами еякулятах бугаїв мейоцити на стадії пахітени зустрічалися з частотою 16–60 %.

Проте, слід відмітити, що через особливості каріотипу великої рогатої худоби (багаточисельність і морфологічна подібність аутосом), проведення класичного пахітеного аналізу у бугаїв має певні труднощі навіть з використанням диференційного забарвлення. Хромосоми на цій стадії, окрім статевих, які формують статевий міхурець, погано піддаються ідентифікації.

З точки зору цитогенетики унікальні можливості для каріотипування мейотичних хромосом, дослідження аберацій хромосом, а також порушень кон'югації гомологічних хромосом представляє синаптонемний комплекс (СК) [10].

На основі аналізу СК були зроблені фундаментальні відкриття сучасної цитогенетики: відкрито явище синаптичної пригонки у гетерозигот за інверсіями і дуплікаціями [11] і явище блокування і селекції клітин на стадії пахітени, встановлені причини порушення гаметогенезу на стадії профазі I у гібридів. Синапсис (кон'югація) гомологічних хромосом – ключова подія профазі I мейозу, яка забезпечує кросинговер і формування хіазм. Не менш важливою подією є десинапсис хромосом — процес, який робить внесок коорієнтацію, сегрегацію гомологів і наступний збалансований розподіл генетичного матеріалу в гаметах.

Слід особливо відмітити, що інформації про структуру СК у бугаїв дуже мало. Дослідження СК у бугаїв на світлооптичному рівні було проведено Сафроною і Піменовою [7], Кузнецовою [3], на електронно-мікроскопічному рівні □ Dollin et al. [9] і Switonski et Gustavsson [15].

Проведений нами цитогенетичний аналіз препаратів розпластаних пахітених клітин сперматогенного ряду показав, що структура СК-аутосомних бівалентів бугая має схожість із СК інших ссавців. Однак спостерігаються відмінності в структурі СК статевих бівалентів бугая порівняно з іншими тваринами, наприклад, миші, свині [1]. Вісі X- і Y-хромосом фарбуються набагато інтенсивніше СК-аутосомних бівалентів, вони є значно товщі і скручені. Часто теломірні кінці статевих хромосом вступають в синапсис, утворюють потовщення у вигляді петель і вузлів. Саме за цими ознаками статеві мейотичні хромосоми легко диференціюються, але їх важко аналізувати. В пахітени всі 29 СК бугаїв повністю спарені, мають вигляд більш коротких і товстих; добре ідентифікується комплекс XY. У більшості випадків вісі статевих хромосом були асоційовані кінець-в-кінець або не зв'язані між собою взагалі. Ці дані узгоджуються з результатами електронно-мікроскопічного дослідження статевого біваленту у бугаїв [12].

Однією з причин, що порушують процес формування повноцінних статевих клітин плідників є наявність у них транслокацій, зокрема Робертсонівських. За транслокацій хромосом формуються асинаптичні і гетеросинаптичні комплекси між негомологічними хромосомами із залученням статевих хромосом. Є припущення, що наявність транслокації у плідника призводить не лише до порушення сперматогенезу на стадії диференціювання сперматоцитів, а також виявляє вплив на сперміогенез, тобто на формування морфологічних структур зрілого спермія.

Висновки. Вивчення хромосомних аномалій в мейозі плідників має важливе значення з метою встановлення механізму розвитку патології гаметогенезу. За наявності порушень репродуктивної функції у плідників потрібно провести їх комплексне генетичне дослідження.

БІБЛІОГРАФІЯ

1. Биохимический и ультраструктурный анализы синаптонемного комплекса в сперматоцитах млекопитающих / Г. Г. Горач, В. В. Сафронов, О. Л. Коломиец, С. Я. Дадашев, Ю. Ф. Богданов // Цитология. – Т. 27. – № 12. – С. 1347–1351.
2. Коломиец, О. Л. СК – как индикатор хромосомной изменчивости: автореферат дисс. ... докт. биол. наук / О. Л. Коломиец. – М., 1998. – 61 с.
3. Кузнецова, Т. В. Цитогенетический анализ клеток сперматогенного ряда у быков / Т. В. Кузнецова, А. В. Родионов, Л. И. Ежова // Мат. I Всес. конф. по цитогенетике с.-х. животных. – М., 1985. – С. 53–54.
4. Кузнецова, Т. В. Мейотические хромосомы эякулированных сперматоцитов быков / Т. В. Кузнецова, А. В. Родионов, А. Ф. Яковлев // Цитология. – 1990. – Т. 32. – № 2 – С. 181–187.
5. Кулешов, Н. П. Частота возникновения и судьба хромосомных аномалий популяции человека : дисс ... д-ра биол. наук. / Н. П. Кулешов. – М., 1979. – 301 с.
6. Курило, Л. Ф. Генетический контроль за половой дифференцировкой и некоторыми этапами репродукции человека / Л. Ф. Курило // Многоликость современной генетики человека. – М.: Уфа, «Гилем». – 2000. – С. 51–66.
7. Сафронова, Л. Д. Кариотипы крупного рогатого скота (*Bos Taurus*) и лошадей (*Equus caballus*) на основе синаптонемных комплексов / Л. Д. Сафронова, Т. И. Пименова // Генетика. – 2000. – Т. 24. – № 4 – С. 708–714.
8. Diemer, T. Developmental and genetic disorders in spermatogenesis / T. Diemer, C. Desjardins // *Gum. Reprod. Update.* – 1999. – Vol. 5. – № 2. – P. 120–140.
9. Dollin, A. E. Synaptonemal complex analysis of hybrid cattle. I. Pachytene substaging and the normal full bloods / A. E. Dollin, J. D. Murray, C. B. Gillies // *Genome.* – 1989. – Vol. 32. □ No 5. – P. 856–864.
10. Moses, M. J. Microstreaming and the synaptonemal complex in cytogenetic studies / M. J. Moses // *J. Abstract Book, Helsinki Chromosome Conference.* – 1977.
11. Moses, M. J. Chromosomal structures in crayfish spermatocytes / M. J. Moses // *J. Biophys. and Biochem. Cytol.* – 1956. – № 2. – P. 215–217.
12. Moses, M. J. Synaptonemal complex karyotyping in spermatocytes of the Chinese hamster / M. J. Moses // *Ibid.* – 1977. – Vol. 60. – No 1. – P. 99–126.
13. Navarro, J. A method for the sequential study of CK by light and electron microscopy / J. Navarro, F. Vidal, M. Quitart [et al.] // *Human Genet.* – 1981. – Vol. 59. – P. 419–423.
14. Popescu, C. F. Les chromosomes meiotiques du eueuf (*Bos taurus*) / C. F. Popescu // *Ann. Genet. Sci. Anim.* – 1971. – No 3. – P. 125–143.
15. Switonski, M. The nature of the 1;29 translocation in cattle as revealed by synaptonemal complex analysis using electron microscopy / M. Switonski, I. Gustavsson, L. Ploen // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1987. – Vol. 44. – P. 103–111.
16. Templado, C. Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man / C. Templado, S. Marina, J. Egozque // *Andrologia.* – 1976. – No 8. – P. 285–289.
17. Templado, C. An analysis of human sperm chromosome aneuploidy / C. Templado, C. Merquez, S. Munne // *Cytogenetic and Cell Genetics.* – 1996. – Vol. 74. – P. 196–200.
18. Templado, C. Improved technique for the study of the meiosis in ejaculates: results of the first 50 consecutive cases / C. Templado, F. Vidal, J. Navarro, J. Egozcue // *Human Genet.* – 1986. – Vol. 72. – P. 275–277.

PEFERENCES

1. Gorach, G. G., O. L. Kolomiyec, S. Ya. Dadachev, and Yu. F. Bogdanov. 1993. Biochimicheskiy i ultrastrukturniy analizy synaptonemalnogo kompleksa v spermatocytach mlekopitajuchcich. – Biochemical and ultrastructural analysis of synaptonemal complex in mammalian spermatocytes. *Zytologia – Zytology.* 27 (12): 1347–1351 (in Russian).

2. Kolomiyc, O. L. 1998. *SK – kak indikator chromosomnoy ismenchivosti – SK – as an indicator of chromosomal variability: Avtoreferat diss. ... d.b.n.* 61 (in Russian).
3. Kusnezova, T. V., A. V. Rodionov, and L. I. Yechova. 1985. Zytogeneticheskiy analiz kletok spermatogennogo rjada u bykov. – Cytogenetic analysis of spermatogenic series bulls. *Mat. I Vsesojusnoj konf. po zytogenetike s.-g. chivotnyc – Mat. I All-Union conference. cytogenetics on agricultural animals.* Moskow. 53–54 (in Russian).
4. Kusnezova, T. V., A. V. Rodionov, and A. F. Jakovlev. 1990. Meyotycheskie chromosomy ejakulirovannykh spermatocytov bykov – Meiotic chromosome ejaculate spermatoocytes bulls. *Zytologia – Zytology.* 32 (2): 181–187 (in Russian).
5. Kulechov, N. P. 1979. Chastota vosniknovenia I sudba chromosomnykh anomalii popylazia cheloveka □ The incidence of chromosomal abnormalities and the fate of the human population. *Dyss. ... doctora boil. nauk.* M. 289.
6. Kurylo, L. F. 2000. Geneticheskiy control sa polovoj dyfferencirovkoj i nekotorymi etapami reproduczii cheloveka – Genetic control of sex differentiation and some stages of human reproduction. – v kn.: *Mnogolikost' sovremennoj genetiki chelovek.* M.: Ufa, «Gilem». 51–66 (in Russian).
7. Safonova, L. D., and T. I. Pimenova. 2000. Kariotypy krupnogo rogatogo scota (Bos Taurus) I lochdej (Equus caballus) na osnove synaptonemnykh kompleksov – Karyotypes of cattle (Bos Taurus) and horses (Equus caballus) on the basis of synaptonemal complexes. *Genetica – Genetics.* 24 (4): 708–714 (in Russian).
8. Diemer, T., and C. Desjardins. 1999. Developmental and genetic disonders in spermatogenesis. *Gum. Reprod.* 5 (2): 120–140.
9. Dollin, A. E., J. D. Murray, C. B. Gillies. 1989. Synaptonemal complex analysis of hybrid cattle. I. Pachytene substaging and the normal full bloods. *Genome.* 32 (5): 856–864.
10. Moses, M. J. 1977. Microsreding and the synaptonemal complex in cytogenetic studies. *J. Abstract Book, Helsinki Chromosome Conference.* 551–557.
11. Moses, M. J. 1956. Chromosomal structures in crayfish spermatoocytes. *J. Biophys. and Biochem. Cytol.* 2: 215–217.
12. Moses, M. J. 1977. Synaptonemal complex karyotyping in spermatoocytes of the Chinese hamster. *Ibid.* 60 (1): 99–126.
13. Navarro, J., F. Vidal, M. Quitart. 1981. A method for the sequential study of CK by light and electron microscopy. *Human Genet.* 59: 419–423.
14. Popescu, C. F. 1971. Les chromosomes meiotiques du eceuf (Bos taurus). *Ann. Genet. Sci. Anim.* 18 (213): 125–143.
15. Switonski, M., I. Gustavsson, L. Ploen. 1987. The nature of the 1;29 translocation in cattle as revealed by synaptonemal complex analysis using electron microscopy. *Cytogenet. Cell Genet.* 44: 103–111.
16. Templado, C., S. Marina, J. Egozque. 1976. Three cases of low chiasma frequency associated with infertility in man. *Andrologia.* 8: 285–289.
17. Templado, C., C. Merquez, S. Munne. 1996. An analysis of human sperm chromosome aneuploidy. *Cytogenetic and Gell Genetics.* 74: 196–200.
18. Templado, C., F. Vidal, J. Navarro, J. Egozcue. 1986. Improved technique for the study of the meiosis in ejaculates: results of the first 50 consecutive cases. *Human Genet.* 72: 275–277.