



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ГЕНЕТИКИ И РАЗВЕДЕНИЯ  
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ-ФИЛИАЛ ФЕДЕРАЛЬНОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО БЮДЖЕТНОГО  
НАУЧНОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЖИВОТНОВОДСТВА-ВИЖ ИМЕНИ  
АКАДЕМИКА Л.К. ЭРНСТА» (ВНИИГРЖ)

## Содержание вДНК в семенной плазме петухов, как потенциальный биомаркер жизнеспособности сперматозоидов

*\*Курочкин Антон Алексеевич  
м. н. с. лаборатории биологии развития, ВНИИГРЖ,  
Притужалова Анна Олеговна  
м. н. с. лаборатории биологии развития, ВНИИГРЖ  
Кузьмина Татьяна Ивановна  
д.б.н., проф., зав. лабораторией биологии развития,  
ВНИИГРЖ*

# Введение

В последние годы в гуманитарной медицине в качестве неинвазивного метода определения качественных показателей спермы используется внеклеточная ДНК (внДНК). Различия в размере обнаруженной внДНК, ее эпигенетике, полиморфизме приводят к различным отклонениям в фертильности спермы. В их числе: взаимосвязь между содержанием вкДНК и оксидативным стрессом; корреляция между содержанием низкомолекулярной внДНК и прогрессивной подвижностью, отклонения в прохождении этапов процесса капацитации спермы. Данный биомаркер (внДНК) также используется в исследованиях женской фертильности, так профилирование внДНК, выделенной из фолликулярной жидкости, используется в качестве неинвазивного и простого метода клинического исхода беременности. внДНК представляет собой фрагменты ДНК (из ядер клеток и митохондрий), высвобождаемая посредством апоптоза, некроза и других механизмов активного высвобождения.

# Введение

Интенсификация отрасли птицеводства приводит к снижению генетического разнообразия кур и утрате редких генотипов, которые могли бы использоваться при создании новых селекционных форм, отвечающих требованиям различных климатических условий.

Поиск биомаркеров имеющих ранний прогностический признак мужских гамет *Gallus Gallus*, является перспективным направлением повышения качественных показателей эякулятов и их репродуктивных характеристик, позволяющий с большей эффективностью сохранять генетические ресурсы сельскохозяйственных птиц.

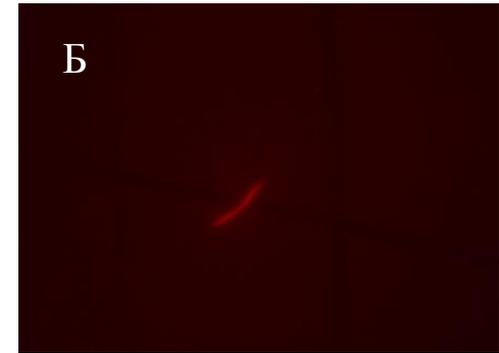
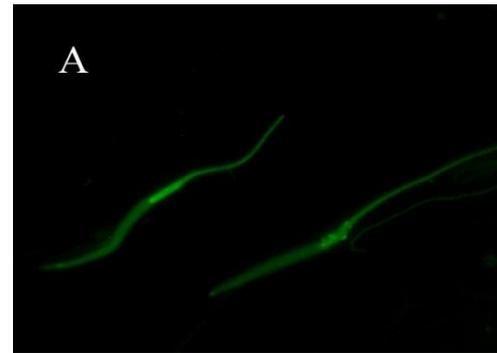
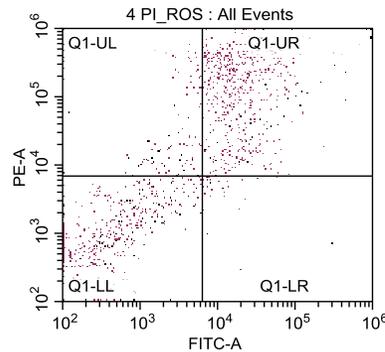
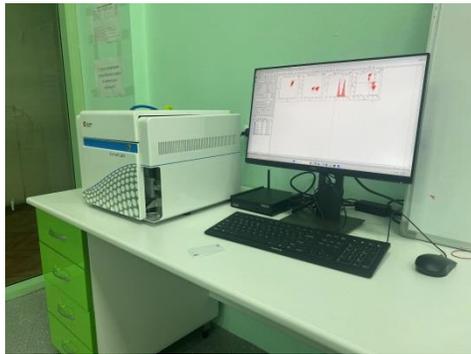
# Материалы и методы

- Исследование проводилось на базе ЦКП «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур», ВНИИГРЖ. Объектом исследования служили петухи породы Царскосельская (n=20) в возрасте 36 недель. Петухи содержались в индивидуальных клетках. Кормление, поение и световой режим экспериментальное поголовье получало в соответствии с возрастными нормами.
- Сперму собирали с помощью метода абдоминального массажа, (Burrows and Quinn, 1935), в пенициллиновые флаконы, дважды в неделю.
- Общую подвижность оценивали на микроскопе Axio Imager A1, (Carl Zeiss Microscopy, Germany), увел. 100х.
- Концентрацию внеклеточной ДНК в семенной плазме нативных эякулятов определяли наборами QuDye dsDNA HS Kit, Lumiprobe, Россия, с помощью флуориметра Qubit



# Материалы и методы

- Определение доли мертвых клеток проводили с помощью флуорохрома пропидия йодид (PI) и флуорохрома DAPI. Клетки анализировали сразу после добавления красителей к исследуемым образцам до конечной концентрации 5 мкг/мл.
- Содержание внутриклеточного  $H_2O_2$  в клетках определяли с помощью 2',7'-дихлорфлуоресцеин диацетат (DCFH-DA) цитометрии, Для этого клетки дважды отмывали PBS (1200 об. / мин. 7 мин) и добавляли в конечной концентрации 5 мкМ/мл с последующей инкубацией в течение 20 мин . Затем осадок дважды отмывали от остатков флуорохрома (1200 об. / мин. в течение 7 мин). При анализе флуоресценции на проточном цитометре выделяли две популяции клеток – с высоким и низким содержанием пероксида водорода.
- Активность митохондрий сперматозоидов петухов оценивали с помощью флуоресцентного красителя TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate). Образцы клеток дважды отмывали в PBS с последующим центрифугированием 1200 об. / мин. в течение 7 мин. Осадок клеток ресуспендировали в PBS и инкубировали с TMRE в конечной концентрации 1 мкМ в течение 30 мин при ( $t = 38.5 \text{ }^\circ\text{C}$ ). После инкубации клетки отмывали от остатков флуорохрома.
- Флуоресценцию клеток анализировали на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman Coulter Life Sciences, USA). В каждом образце оценивали не менее 10000 клеток.



*Рис. 1. проточный цитометр CytoFlex BeckmanCoulter Life Sciences, USA, точечный график анализа клеток гранулы*

*Рис. 2. Окраска сперматозоидов петухов флуорохромами DCFH-DA (А), PI (Б). Оценка образцов под флюоресценцией при увеличении 1000x на микроскопе Axio Imager A1, (Carl Zeiss Microscopy, Germany).*

# Результаты

Таблица 1. Клеточные показатели нативных эякулятов петухов

№ Петуха	внДНК, нг/мл	PI-, %	PI+, %	TMRE+, %	TMRE+/DAPI+, %	PI-/ROS+, %
1	2,68±0,12	75,60±2,06	24,40±3,56	75,38±8,09	11,61±1,29	17,39±2,61
2	2,58±0,92	84,07±4,20	15,93±5,94	79,06±8,98	12,89±0,44	14,14±9,16
3	2,34±0,30	72,44±1,80	37,56±20,02	67,83±4,07	7,62±1,66	9,58±4,62
4	1,41±0,14	76,28±2,47	23,73±4,26	70,94±3,23	14,04±2,06	16,40±1,96
5	1,53±0,11	82,07±2,24	17,94±3,17	79,56±10,29	12,74±0,74	8,28±2,68
6	1,86±0,24	71,43±9,65	28,57±16,70	79,71±4,89	9,29±1,51	11,29±2,27
7	2,44±0,44	67,06±6,76	32,94±11,70	79,45±0,98	8,92±0,53	13,31±4,05
8	1,37±0,08	74,86±1,73	25,14±2,98	77,08±4,11	12,90±2,67	18,36±6,65
9	1,29±0,07	76,90±3,54	22,93±6,36	78,47±0,16	20,41±1,53	17,46±3,01
10	1,35±0,12	71,53±9,93	28,47±17,19	85,05±1,78	25,78±3,78	16,93±4,60
11	1,14±0,03	76,42±3,83	23,58±6,63	68,80±2,02	6,25±1,01	17,95±2,94
12	1,06±0,09	82,14±3,13	17,86±3,13	71,46±4,70	5,74±1,28	20,90±9,45
13	2,18±0,50	80,20±4,69	19,80±4,69	74,74±4,00	6,7±0,59	11,44±2,89
14	2,2±0,04	79,80±1,27	20,20±1,27	73,23±2,58	4,56±0,95	24,11±12,35
15	2,4±0,75	76,41±2,94	23,59±2,94	77,59±3,12	6,96±1,12	15,77±4,36
16	1,66±0,11	75,66±7,25	24,34±7,25	74,95±2,54	3,7±0,59	10,86±1,82
17	1,63±0,06	85,10±2,47	14,90±2,47	79,52±5,34	2,76±0,90	13,61±5,36
18	1,59±0,35	75,79±3,25	24,32±3,33	70,70±4,74	6,92±1,23	15,77±5,39
19	1,68±0,16	73,71±2,60	26,29±2,60	68,00±1,78	3,44±0,51	17,17±6,74
20	0,94±0,04	81,38±4,64	18,62±4,64	78,71±4,30	6,57±1,03	7,61±3,39

# Заключение

- Выявлены достоверные корреляционные связи между внДНК и долей клеток с поврежденной плазматической мембраной ( $r=0,35$ ,  $p<0,05$ ), что свидетельствует о возможной связи данного биомаркера с некротическими и апоптотическими процессами, происходящими в клетках.
- Установлены достоверные корреляционные связи ( $r=0,51$ ,  $p<0,05$ ) между долей клеток, подверженных оксидативному стрессу, долей клеток с поврежденной плазматической мембраной и высокой митохондриальной активностью, что говорит о негативном влиянии активных форм кислорода на целостность плазматической мембраны и взаимосвязь повышенной генерации АФК с функционированием митохондрий.
- Коэффициент вариации показателя внДНК составил 30,28%, что свидетельствует о возможности использования предлагаемого биомаркера (уровень содержания внДНК в семенной жидкости Gallus Gallus) в качестве предиктивного прогностического критерия оценки качества мужских гамет.

A large group of white chickens with red combs is shown in a farm setting. The chickens are densely packed, and the background is a plain, light-colored wall. The text "Спасибо за внимание!" is overlaid in the center of the image.

Спасибо за внимание!

Исследования выполнены в рамках гос. задания НИОКТР 124020200127-7