

© Л.В.Осадчук, М.А.Клещев, 2016
УДК 612.663.051:599.323.4

Л.В.Осадчук, М.А.Клещев

МЕЖЛИНЕЙНЫЕ РАЗЛИЧИЯ ПОКАЗАТЕЛЕЙ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У ИНБРЕДНЫХ МЫШЕЙ

Сектор эндокринологической генетики (зав. — канд. биол. наук А.В.Осадчук), Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск; Научно-исследовательская часть (руков. — д-р эконом. наук Е.В.Рудой), Новосибирский государственный аграрный университет

Цель настоящей работы состояла в сравнительном исследовании основных параметров сперматогенеза у мышей инбредных линий РТ (n=99) и СВА/Лас (n=81), начиная с пубертатного периода развития до 80-х суток. Определяли количество сперматозоидов в каудальных отделах обоих придатков семенника (эпидидимальный резерв), оценивали морфологические характеристики и подвижность сперматозоидов, а также массу тела, семенников и их придатков. Начиная с пубертатного периода и далее, обнаружено, что у самцов линии СВА/Лас по сравнению с РТ имеются более низкие значения массы семенников и количества эпидидимальных сперматозоидов. Однако функциональные возможности сперматозоидов у самцов линии СВА/Лас по сравнению с таковыми у самцов линии РТ были выше, поскольку, начиная с пубертатного периода они характеризовались более низкой частотой аномальных форм, а в постпубертатный период — более высоким относительным содержанием подвижных сперматозоидов. Таким образом, у самцов исследованных лабораторных мышей межлинейные различия в ключевых показателях сперматогенеза, связанных с плодовитостью, начинают проявляться в пубертатный период, а их межлинейная вариабельность может иметь компенсаторный характер.

Ключевые слова: семенник, половое созревание, эпидидимальный резерв, подвижность и строение сперматозоидов, инбредные линии мышей

Одним из важнейших компонентов, определяющих мужскую плодовитость, является сперматогенез. Выработка сперматозоидов и приобретение ими функциональной активности представляет собой сложный процесс, который проходит в семеннике, придатке семенника и завершается в репродуктивном тракте самки [3, 5]. Он регулируется эндокринными и паракринными факторами, среди которых тестостерон и фолликулостимулирующий гормон (ФСГ) принципиально важны для инициации и поддержания сперматогенеза [3, 7]. Сустентоциты (клетки Сертоли) семенника играют ведущую роль в сперматогенезе, организуя его пространственно и функционально, обеспечивая функционирование гематотестикулярного барьера и снабжая развивающиеся половые клетки нутриентами и ростовыми факторами [10, 11]. Количество сустентоцитов определяет размеры семенников, число половых клеток в них и выработку сперматозоидов [3, 8, 10].

Инбредные линии мышей являются перспективной моделью для изучения физиологической и наследственной природы сперматогенеза, поскольку могут сильно отличаться различными функциональными маркерами сперматогенеза

[1, 2]. Многие гены и процессы, вовлеченные в сперматогенез, по-видимому, идентичны у мыши, человека и сельскохозяйственных животных, что позволяет с известной осторожностью переносить полученные данные на человека и другие виды животных [3]. Мыши многих инбредных линий, как правило, хорошо размножаются и не имеют серьезных репродуктивных нарушений и, таким образом, могут представлять собой мощный источник естественного наследственного разнообразия плодовитости.

Основными функциональными маркерами сперматогенеза являются выработка, подвижность и строение сперматозоидов, которые тесно связаны с плодовитостью [3, 4, 6, 8, 9]. В наших предыдущих исследованиях у взрослых самцов мышей 13 инбредных линий обнаружены межлинейные различия количества сперматозоидов в придатке семенника, доли подвижных и морфологически аномальных сперматозоидов, при этом наиболее контрастными оказались линии РТ и СВА/Лас [1, 2]. Цель настоящей работы — установить, когда у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас появляются межлинейные различия перечисленных выше показателей и выявить характер их взаимосвязи, начиная с пубертатного

Сведения об авторах:

Осадчук Людмила Владимировна (e-mail: losadch@bionet.nsc.ru), Клещев Максим Александрович (e-mail: max82cll@bionet.nsc.ru), сектор эндокринологической генетики, Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, г. Новосибирск, пр. Академика Лаврентьева, 10; Научно-исследовательская часть, Новосибирский государственный аграрный университет, 630039, г. Новосибирск, ул. Добролюбова, 160

и заканчивая постпубертатным периодом онтогенеза (возраст от 35 до 80 сут).

Материал и методы. Исследование проведено на самцах мышей (n=180) двух инбредных линий РТ (n=99) и СВА/Лас (n=81) в возрасте 35, 45, 70 и 80 сут, не имевших сексуального опыта. Все экспериментальные процедуры выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации по защите позвоночных животных, используемых для лабораторных целей. Мыши росли в стандартных условиях вивария при фиксированном световом режиме 12 ч/12 ч (день — ночь соответственно) и температуре 22 °С, воду и корм животные получали без ограничений. Самок на последней неделе беременности отсаживали в отдельные клетки, день родов считали 1-ми сутками жизни потомства. На следующие сутки после родов подсчитывали величину помета у каждой самки. Через 1 нед после родов число детёнышей в помёте корректировали до 3–5 (в среднем 4,0±0,1). Потомство отсаживали от матерей в возрасте 30 сут, формируя группы самцов из разных пометов, но одного возраста и одной линии по 4–6 особей. Для снятия эффекта группового содержания за 4 сут до декапитации животных отсаживали в индивидуальные клетки (изоляция). Самцов декапитировали в одно и то же время суток (12.00–13.00), предварительно проводили их взвешивание.

Немедленно после декапитации у самцов выделяли семенники и каудальную часть обоих придатков семенника и взвешивали. Подсчитывали количество сперматозоидов в каудальном отделе обоих придатков (эпидидимальный резерв сперматозоидов), которое у крыс и мышей положительно коррелирует с суточной выработкой сперматозоидов семенниками и фертильностью [3, 4, 6, 8, 9]. Каждую пару придатков семенника измельчали в 200 мкл культуральной среды DMEM (Биолот, Россия), добавляли 800 мкл среды, после встряхивания в шейкере в течение 10 мин суспензию фильтровали через нейлоновый фильтр Falcon (диаметр сетки 70 мкм). Температуру среды поддерживали на уровне 37 °С при всех манипуляциях. Количество сперматозоидов подсчитывали в камере Горяева под световым микроскопом при увеличении 200 после окраски суспензии сперматозоидов 1% водным раствором эозина. Долю подвижных сперматозоидов оценивали с помощью спермоанализатора SFA 500-2 (Биола, Россия). Для подсчета аномальных головок сперматозоидов аликвоту суспензии сперматозоидов, окрашенных эозином, помещали на предметное стекло, делали мазок. После высыхания мазок заключали в канадский бальзам и покрывали предметным стеклом. Подсчет аномальных головок сперма-

тозоидов проводили под световым микроскопом при увеличении 400 по методике, описанной ранее [1, 2].

Проводили двухфакторный дисперсионный анализ (главные факторы — генотип и возраст) с использованием пакета программ «STATISTICA 8.0». Для всех исследованных показателей высчитывали выборочную среднюю и ошибку выборочной средней. Различия между выборочными средними оценивали с использованием теста Duncan в рамках двухфакторного дисперсионного анализа. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты исследования. При внутрилинейных скрещиваниях величина помета у мышей линии РТ оказалась значимо меньше, чем у СВА/Лас, и составила $5,3 \pm 0,2$ (n=36) и $6,1 \pm 0,2$ (n=21) соответственно ($P < 0,01$).

Двухфакторный дисперсионный анализ позволил установить влияние генотипа ($F_{1,156} = 202,19$; $P < 0,001$), возраста ($F_{3,156} = 218,03$; $P < 0,001$) на массу тела, а также взаимодействие факторов ($F_{3,156} = 6,13$; $P < 0,001$). Масса тела значимо росла у самцов обоих генотипов от 35-х до 70-х суток, достигая в этот период максимального уровня ($P < 0,001$) и не увеличиваясь в дальнейшем. В каждом возрастном периоде самцы СВА/Лас по сравнению с РТ характеризовались большей массой тела ($P < 0,001$, таблица). Двухфакторный дисперсионный анализ выявил значимое влияние генотипа ($F_{1,156} = 4,88$; $P < 0,05$) и возраста ($F_{3,156} = 68,22$; $P < 0,001$) на массу семенников, которая у самцов обеих линий прогрессивно и значимо росла от 35-х до 70-х суток постнатальной жизни, достигая на 70-е сутки максимальных значений и не увеличиваясь в дальнейшем. Самцы линии РТ, начиная с 45-х суток и позже, имели большую массу семенников, чем мыши линии СВА/Лас (см. таблицу). В изученный период онтогенеза обнаружено значимое влияние возраста только на массу обоих придатков семенника ($F_{3,156} = 257,76$; $P < 0,001$). Значение этого признака прогрессивно росло у самцов обеих линий от 35-х до 70-х суток, не увеличиваясь в дальнейшем (см. таблицу).

Установлено значимое влияние генотипа ($F_{1,153} = 22,18$; $P < 0,001$) и возраста ($F_{3,153} = 496,70$;

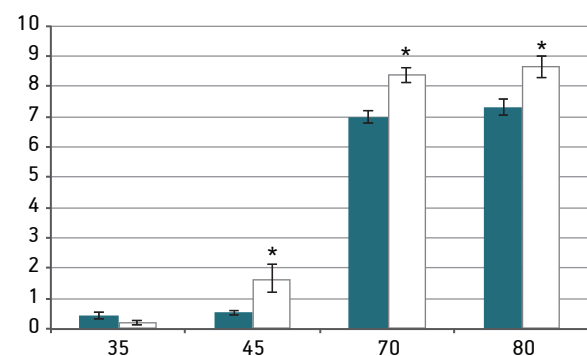
Масса тела и репродуктивных органов у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас

Исследованный показатель	Возраст (сут) и линия мышей							
	35		45		70		80	
	РТ (n=19)	СВА/Лас (n=20)	РТ (n=11)	СВА/Лас (n=14)	РТ (n=35)	СВА/Лас (n=31)	РТ (n=18)	СВА/Лас (n=16)
Масса тела, г	13,5±0,4	16,2±0,4*	15,2±0,4	18,6±0,4*	20,8±0,4	25,2±0,3*	18,7±0,4	24,7±0,3*
Масса семенников, мг	95,3±4	95±3	109±6	98±3*	134,5±2,7	130,8±1,4	132±4	125,2±2,8
Масса придатков семенников, г	5,4±0,3	5,9±0,4	7,1±0,5	7,2±0,4	13,8±0,3	13,8±0,3	13,2±0,5	13,2±0,4

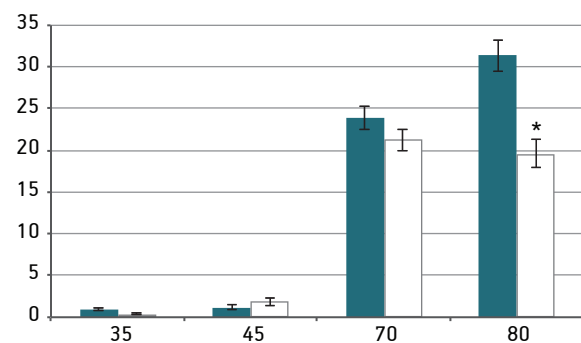
* Межлинейные различия у самцов одного возраста значимы при $P < 0,05$.

Примечание. В скобках — количество животных в группе.

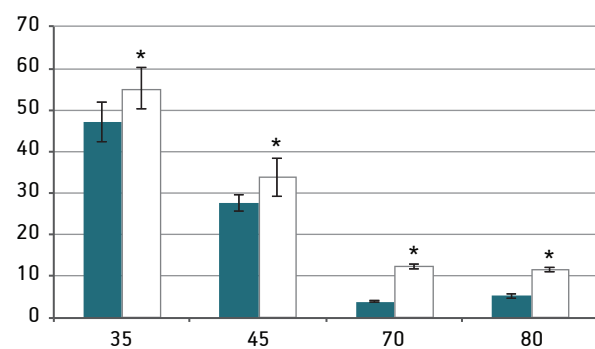
$P<0,001$) на количество сперматозоидов в придатках, а также значимое взаимодействие факторов ($F_{3,153}=4,49$; $P<0,01$). Количество сперматозоидов увеличивалось в исследуемый период онтогенеза у самцов обеих линий и в возрасте 70 сут достигало максимального уровня. Таким образом, у самцов мышей обеих линий к 70-м суткам постна-



а



б



в

■ CBA/Lac □ PT

Показатели сперматогенеза у самцов мышей инбредных линий PT и CBA/Lac.

а — количество эпидидимальных сперматозоидов; б — относительное содержание подвижных сперматозоидов; в — относительное содержание аномальных головок сперматозоидов. По оси абсцисс: возраст самцов (сут); по осям ординат: а — количество сперматозоидов в обоих придатках (млн/оба придатка); б — доля подвижных сперматозоидов (% от общего количества); в — доля морфологически аномальных головок сперматозоидов (% от общего количества). Звездочки — значимые межлинейные различия у самцов одного возраста при $P<0,05$; вертикальные отрезки — значения ошибки средних

тальной жизни развитие этого признака завершалось. Начиная с 45-х суток и позже, количество сперматозоидов в придатках у самцов мышей линии PT было значимо выше, чем у CBA/Lac ($P<0,01$; рисунок, а).

Двухфакторный дисперсионный анализ доли подвижных сперматозоидов позволил выявить значимое влияние генотипа ($F_{1,149}=11,23$; $P<0,01$), возраста ($F_{3,149}=160,85$; $P<0,0001$) и взаимодействие факторов ($F_{3,149}=6,55$; $P<0,001$). Доля подвижных сперматозоидов значительно увеличивалась к 70-м суткам у самцов обеих линий, достигая в этот период максимального значения лишь у самцов PT, в то время как у самцов CBA/Lac этот показатель продолжал расти до 80-х суток ($P<0,001$; см. рисунок, б). На 80-е сутки доля подвижных сперматозоидов у самцов линии CBA/Lac была значимо выше, чем у мышей линии PT ($P<0,001$; см. рисунок, б).

Двухфакторный дисперсионный анализ позволил выявить значимое влияние генотипа ($F_{1,126}=33,42$; $P<0,0001$) и возраста ($F_{3,126}=257,21$; $P<0,0001$) на долю морфологически аномальных сперматозоидов. Последняя значительно снижалась к 70-м суткам постнатального развития у самцов обеих линий, достигая к этому возрасту минимальных значений и не меняясь в дальнейшем ($P<0,001$; см. рисунок, в). В любом возрасте доля аномальных сперматозоидов у самцов линии CBA/Lac была значимо ниже, чем у PT ($P<0,05$; см. рисунок, в).

Обсуждение полученных данных. У самцов мышей линии PT и CBA масса тела и репродуктивных органов (семенников и придатков) достигала дефинитивных значений к возрасту 70 сут, так же как количество эпидидимальных сперматозоидов, доля подвижных и морфологически аномальных сперматозоидов, за исключением самцов линии CBA/Lac, у которых доля подвижных сперматозоидов продолжала увеличиваться до 80-х суток. Таким образом, половой зрелости, если ее определять по доле подвижных сперматозоидов, самцы линии CBA/Lac достигают позже, чем мыши линии PT, в период, когда другие показатели сперматогенеза у самцов этой линии уже находятся на дефинитивном уровне.

Плодовитость у самцов млекопитающих одного и того же вида значительно варьирует, что может быть обусловлено влиянием генетических факторов на выработку, нормальное строение и подвижность сперматозоидов [4, 6]. В нашей работе установлено, что самцы линии PT характеризуются более высоким эпидидимальным резервом сперматозоидов и большей массой семенников, чем самцы линии CBA/Lac, начиная с периода полового созревания, т. е. изменчивость этих

признаков имеет координированный характер. Учитывая функциональную взаимосвязь количества суспензителей в семеннике, выработки сперматозоидов и размера семенников [10], вероятно, что обнаруженные межлинейные различия могут быть обусловлены большим количеством суспензителей в семенниках у самцов линии РТ, чем СВА/Лас. Прямой подсчет суспензителей мог бы дать дополнительную информацию о причинах межлинейных различий выработки сперматозоидов и массы семенников у самцов этих линий.

Более низкое количество эпидидимальных сперматозоидов у самцов линии СВА/Лас, чем РТ, сопряжено с пониженной долей морфологически аномальных сперматозоидов и повышенной — подвижных сперматозоидов, т. е. наблюдается компенсаторное усиление одних параметров сперматогенеза при понижении других. Полученные данные показывают, что изменчивость параметров сперматогенеза может иметь компенсаторный характер, что позволяет поддерживать фертильность самцов на оптимальном уровне, достаточном для успешного размножения. Нормальное строение и адекватная подвижность сперматозоидов, влияющая на способность преодолевать физические барьеры в репродуктивном тракте самок и оплодотворять яйцеклетку, имеют решающее значение в формировании репродуктивного потенциала самцов, таким образом, плодовитость самцов в значительной степени может определяться этими показателями [3, 6, 8].

В настоящее время поиску конкретных признаков сперматозоидов, связанных с мужской плодовитостью, стали уделять большое внимание в самом разном контексте: в репродуктивной медицине, при разведении крупного рогатого скота и поддержании высокого репродуктивного потенциала животных в природных популяциях. Можно надеяться, что дальнейшее исследование фенотипической и генетической гетерогенности компонентов мужской плодовитости и связанных с ней морфологических и функциональных дефектов сперматозоидов позволит найти четкие прогностические критерии, пригодные для практического применения в диагностике мужского бесплодия и субфертильности, а также селекционных программах улучшения репродуктивного потенциала домашних животных.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 15-16-30003) в части оценки параметров сперматогенеза.

ЛИТЕРАТУРА

- Осадчук Л.В. Тестикулярная функция у мышей инбредных линий BALB/cLAC, РТ и СВА/Лас // Росс. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2010. Т. 96, № 2. С. 183–190.
- Осадчук Л.В., Тупикин А.Е., Морозов И.В. и др. Фенотипическая вариабельность сперматогенеза и поиск ассоциаций с геным полиморфизмом у мышей 13 инбредных линий // Генетика. 2012. Т. 48, № 8. С. 966–975.
- Borg C.L., Wolski K.M., Gibbs G.M., O'Bryan M.K. Phenotyping male infertility in the mouse: how to get the most out of a 'non-performer' // Hum. Reprod. Update. 2010. Vol. 16. P. 205–224.
- Chapin R.E., Sloane R.A., Haseman J.K. The relationships among reproductive endpoints in Swiss mice, using the reproductive assessment by Continuous Breeding database // Fundam. Appl. Toxicol. 1997. Vol. 38. P. 129–142.
- Cooper T.G. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old Problem // Asian J. Androl. 2007. Vol. 9. P. 533–539.
- Gomendio M., Malo A.F., Garde J., Roldan E.R.S. Focus on determinants of male fertility. Sperm traits and male fertility in natural populations // Reproduction. 2007. Vol. 134. P. 19–29.
- Holdcraft R.W., Braun R.E. Hormonal regulation of spermatogenesis // Int. J. Androl. 2004. Vol. 27. P. 335–342.
- Perreault S.D., Cancel A.M. Significance of incorporating measures of sperm production and function into rat toxicology studies // Reproduction. 2001. Vol. 121. P. 207–216.
- Robb G.W., Amann R.P., Killian G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adult rats // J. Reprod. Fertil. 1978. Vol. 54. P. 103–107.
- Sharpe R.M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood // Reproduction. 2003. Vol. 125. P. 769–784.
- Tarulli G.A., Stanton P.G., Meachem S.J. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? // Biol. Reprod. 2012. Vol. 87. P. 1–11.

Поступила в редакцию 09.10.2015

Получена после доработки 10.12.2015

INTERSTRAIN DIFFERENCES IN THE PARAMETERS OF SPERMATOGENESIS IN INBRED MICE

L.V. Osadchuk, M.A. Kleshyov

The aim of the present work was a comparative study of basic parameters of spermatogenesis in mice of inbred PT (n=99) and CBA/Lac (n=81) strains, starting with the puberal period of development until Day 80. The number of spermatozoa was measured in the caudal portions of both epididymides (epididymal reserve), morphological characteristics and spermatozoa motility were evaluated, and body, testes and epididymal weight was determined. Starting from puberty and thereafter, it was found that CBA/Lac males as compared with RT mice had lower testicular mass and epididymal spermatozoa number. However, spermatozoa functional capacity of CBA/Lac males was higher as compared to that of PT mice, since starting with the puberal period, they were characterized by a lower frequency of abnormal forms, and in the post-puberal period — by higher relative concentrations of motile spermatozoa. Thus, in the males of laboratory mice studied, the interstrain differences in the key parameters of spermatogenesis related to fertility, began to emerge in the puberal period, and their interstrain variability may have a compensatory character.

Key words: *testis, puberty, epididymal reserve, spermatozoa motility and structure, inbred lines of mice*

Sector of Endocrinological Genetics, RAS SB Institute of Cytology and Genetics Novosibirsk; Scientific Research Department, Novosibirsk State Agrarian University