

УДК 575.113:591.463.2:611.013.12:575.22.5:599.323.4

## СПЕРМАТОГЕННАЯ ФУНКЦИЯ У МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ BALB/cLac, DD/He И ИХ F<sub>1</sub> РЕЦИПРОКНЫХ КРОССОВ

© 2013 г. М.А. Клещев, А.В. Осадчук, Л.В. Осадчук

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: losadch@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 6 июля 2012 г. Принята к публикации 17 сентября 2012 г.

Ранее было установлено, что инбредная линия мышей DD/He по сравнению с другими 13 исследованными в этом отношении линиями обладает наиболее низкой долей подвижных и морфологически аномальных сперматозоидов. Линия BALB/cLac, напротив, характеризуется самой высокой долей подвижных и аномальных сперматозоидов. Было сделано предположение, что сниженная доля подвижных сперматозоидов у мышей линии DD/He, а также высокая доля аномальных сперматозоидов у BALB/cLac обусловлены мутациями в генах Y-хромосомы. Для того чтобы проверить эту гипотезу, у самцов F<sub>1</sub> реципрокных кроссов DD/He × BALB/cLac и BALB/cLac × DD/He исследовали подвижность и морфологию сперматозоидов, а также количество сперматозоидов в каудальных эпидидимисах, массу тела и семенников. Установлены эффекты гетерозиса по всем изучаемым признакам, за исключением доли подвижных сперматозоидов. Выявлено влияние отцовских эффектов на долю атипичных сперматозоидов и массу семенников, что может указывать на участие генов (гена) Y-хромосомы в генетическом контроле этих признаков. Обнаружены материнские эффекты на долю подвижных сперматозоидов.

**Ключевые слова:** инбредные линии мышей, сперматогенез, реципрокные скрещивания.

### ВВЕДЕНИЕ

Сперматогенез представляет собой серию высокоспециализированных, строго регулируемых процессов, включающих митоз, мейоз и дифференцировку клеток-предшественников сперматозоидов. Этот процесс проходит в эпителии извитых семенных канальцев семенников. Развитие и поддержание сперматогенеза у взрослых особей зависят от функционирования клеток Сертоли семенника и контролируются гонадотропинами (ЛГ и ФСГ) и стероидными гормонами (тестостерон и эстрадиол). Сформированные сперматозоиды из семенных канальцев поступают в придаток семенника – эпидидимис, где они созревают и приобретают подвижность. Нормальное протекание процессов формирования сперматозоидов в семенниках и их созревания в эпидидимисе в конечном итоге формирует качество спермы –

совокупность признаков, определяющих ее оплодотворяющую способность. Основными показателями качества спермы считаются концентрация сперматозоидов в эякуляте, доля подвижных сперматозоидов и доля морфологически аномальных форм сперматозоидов (Kishikawa *et al.*, 1999; Guzick *et al.*, 2001).

В настоящее время механизмы генетического контроля сперматогенной функции изучаются главным образом с использованием нокаутных мышей, у которых блокирование функции определенного гена-кандидата приводит к резкому снижению количества и/или качества сперматозоидов и потере фертильности (Adham *et al.*, 2005; Verhoeven *et al.*, 2010). Такие животные являются моделями репродуктивных патологий и служат для выявления причин мужского бесплодия и способов его коррекции. Другой подход к изучению генетической и физиологической регуляции сперматогенеза связан с

использованием инбредных линий мышей. У лабораторных мышей показана существенная межлинейная изменчивость по показателям качества спермы, которая основана, по-видимому, на генах «мягкого» действия, фенотипическое проявление которых не препятствует процессу размножения. Очевидно, что с такими генами связан наблюдаемый в популяциях животных полиморфизм по репродуктивной функции (Осадчук, Науменко, 1983). Поэтому мыши инбредных линий могут служить удобной моделью для изучения генетических основ естественной изменчивости по сперматогенной функции, которой уделяется существенно меньше внимания по сравнению с исследованием генетически и фармакологически измененных животных – моделей репродуктивных патологий.

Ранее нами у 13 линий лабораторных мышей была выявлена существенная фенотипическая изменчивость по спермопродукции, доле подвижных сперматозоидов и доле морфологически аномальных головок сперматозоидов. Было установлено, что животные линии DD/He обладают наиболее низкой долей подвижных сперматозоидов по сравнению с другими 12 линиями. У самцов линии BALB/cLac показана самая высокая среди этих линий доля аномальных головок сперматозоидов при относительно высокой доле подвижных сперматозоидов (Осадчук и др., 2012). Наличие у этих двух линий указанных особенностей сперматогенной функции с сильным «негативным» эффектом на фертильность делает их интересной моделью для изучения генетических причин нарушения фертильности. Представляет интерес поиск генов, мутации в которых могли бы обусловить столь аномальные показатели качества сперматозоидов у животных линий BALB/cLac и DD/He. Сейчас известно уже более 200 генов, участвующих в формировании качества спермы (Zheng, Yang, 2010), но важнейшее значение имеют гены, лежащие на Y-хромосоме, которые контролируют развитие семенников, пролиферацию и дифференцировку клеток Сертоли и клеток-предшественников сперматозоидов (Delbridge, Graves, 1999). Мутации в этих генах имеют, как правило, сильное фенотипическое проявление и могут быть ассоциированы с существенным уменьшением продукции сперматозоидов или даже их отсутствием (Navarro-Costa *et al.*, 2010),

повышенным числом аномальных форм сперматозоидов (Krzanowska *et al.*, 1995; Styryna *et al.*, 2003) и сниженными показателями их подвижности. Можно предположить, что мутации генов, лежащих на Y-хромосоме, могут быть причиной сниженной подвижности сперматозоидов у линии DD/He, а также высокой доли морфологически аномальных сперматозоидов у BALB/cLac. Следует отметить, что у линии DD/He обнаружены две неконсервативные мутации гена *styu*, расположенные в функционально важном районе (I63T в домене HMGbox) белка UR-2. Ген *styu* Y-хромосомы участвует в формировании эмбриональных семенников и определении пола. Кроме того, этот ген экспрессируется у взрослых особей в мужских половых клетках и клетках Сертоли (Krzanowska *et al.*, 1995; Harley *et al.*, 2003; Kashimada, Koopman, 2010). Представляло интерес оценить влияние Y-хромосомы на сперматогенные показатели у мышей инбредных линий BALB/cLac и DD/He, контрастных по подвижности и морфологии сперматозоидов.

Было проведено реципрокное скрещивание мышей линий BALB/cLac и DD/He. У самцов инбредных линий и их реципрокных гибридов (F<sub>1</sub>) были оценены количество сперматозоидов в каудальных эпидидимисах, доля подвижных и морфологически аномальных сперматозоидов. Дополнительно как для реципрокных гибридов, так и для родительских инбредных линий анализировались масса тела и семенников.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Животные

Экспериментальные животные содержались в стандартных условиях вивария ИЦиГ СО РАН. Для эксперимента использовали самцов инбредных линий мышей BALB/cLac и DD/He. Реципрокных гибридов первого поколения получали путем скрещивания самок линии BALB/cLac с самцами линии DD/He (гибриды BALB × DD) и самок линии DD/He с самцами BALB/cLac (гибриды DD × BALB) в возрасте 2–3 месяцев. В возрасте 30 дней потомство отсаживали от матери, формируя однополые группы по 4–6 самцов. Животных содержали в стандартных пластиковых клетках размером

36 × 20 × 15 см при свободном доступе к воде и пище, фиксированном световом дне (12 ч света: 12 ч темноты) и температуре (+22 °С). Сперматогенные и морфометрические параметры оценивали у самцов в возрасте 90–95 дней. Для снятия эффектов группового содержания за пять дней до забоя самцов рассаживали в индивидуальные клетки поодиночке. Количество самцов каждого генотипа составляло от 25 до 34 (всего 115 особей).

### Показатели качества сперматозоидов

Самцов взвешивали, после декапитации выделяли и взвешивали оба семенника и каудальных эпидидимиса. Эпидидимисы немедленно помещали в 200 мкл среды F-12(НАМ) : DMEM (в соотношении 1 : 1) с 3 %-й бычьей сывороткой, мелко измельчали, добавляли 800 мкл той же среды и встряхивали на шейкере в течение 10 мин. Полученную взвесь фильтровали через нейлоновые фильтры Falcon (диаметром сетки 70 мкм) в пластиковые пробирки. Долю подвижных сперматозоидов определяли с использованием анализатора фертильности спермы SFA-500-2 (НПФ «Биола», Москва). Количество сперматозоидов в аликвоте суспензии сперматозоидов, окрашенной 1 %-м раствором эозина, подсчитывали визуально в камере Горяева с использованием светового микроскопа при увеличении ×200. Результаты пересчитывали на 1 мл исходной суспензии, что соответствовало количеству сперматозоидов в обоих эпидидимисах.

Для подсчета аномальных головок сперматозоидов суспензию окрашенных 1 %-м раствором эозина сперматозоидов наносили на предметное стекло и делали мазок. Мазок фиксировали канадским бальзамом и покрывали покровным стеклом. Исследовали первые 300 сперматозоидов под световым микроскопом при увеличении ×400 по описанной методике (Даев, Дукельская, 2003).

### Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA), пакет компьютерных программ STATISTICA (версия 6.0).

Для сравнения групп в рамках дисперсионного анализа применяли тест множественного сравнения Дункана (Duncan's test). Данные в рисунках и таблице представлены как средняя арифметическая и ее ошибка (Mean ± SEM).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

При сравнении самцов инбредных линий и их F<sub>1</sub> реципрокных кроссов установлена существенная генетическая изменчивость по массе тела ( $F_{3,119} = 67,323, p < 0,01$ ), семенников ( $F_{3,120} = 79,698, p < 0,01$ ), количеству сперматозоидов ( $F_{3,111} = 43,573, p < 0,01$ ), доле подвижных ( $F_{3,109} = 34,038, p < 0,01$ ) и аномальных сперматозоидов ( $F_{3,115} = 453,48, p < 0,01$ ).

Масса тела (табл.) у самцов двух реципрокных кроссов была достоверно ( $p < 0,01$ , Duncan's test) выше массы тела самцов родительских линий, при этом масса тела самцов BALB × DD была достоверно выше, чем масса тела самцов DD × BALB ( $p < 0,01$ , Duncan's test).

Масса семенников у самцов генотипа BALB × DD была достоверно выше, чем у самцов обеих инбредных линий и самцов генотипа DD × BALB ( $p < 0,01$ , Duncan's test). Масса семенников гибридов DD × BALB была достоверно выше, чем у животных линии BALB/Lac ( $p < 0,01$ , Duncan's test) и DD/He ( $p < 0,01$ , Duncan's test).

Количество сперматозоидов у самцов обоих реципрокных гибридов (рис., а) было достоверно выше, чем у самцов инбредных линий ( $p < 0,01$ , Duncan's test). При этом количество сперматозоидов у гибридов BALB × DD не отличалось от такового у гибридов BALB × DD.

### Таблица

Морфометрические показатели самцов мышей двух инбредных линий и их F<sub>1</sub> реципрокных кроссов

Генотип	Масса тела, г	Масса семенников, мг
BALB/cLac	25,03 ± 0,44	164,58 ± 3,37
DD/He	25,61 ± 0,37	206,19 ± 2,84
BALB × DD	31,73 ± 0,40	271,80 ± 8,34
DD × BALB	29,63 ± 0,32	229,59 ± 4,27

Примечание. Количество животных в группе варьировало от 25 до 32.

Доля подвижных сперматозоидов (рис., б) у самцов обоих реципрокных кроссов была достоверно ниже, чем у самцов линии BALB/cLac, но достоверно выше, чем у самцов линии DD/He ( $p < 0,01$ , Duncan's test). Доля подвижных сперматозоидов была достоверно выше у гибридов BALB × DD, чем у гибридов DD × BALB ( $p < 0,05$ , Duncan's test).

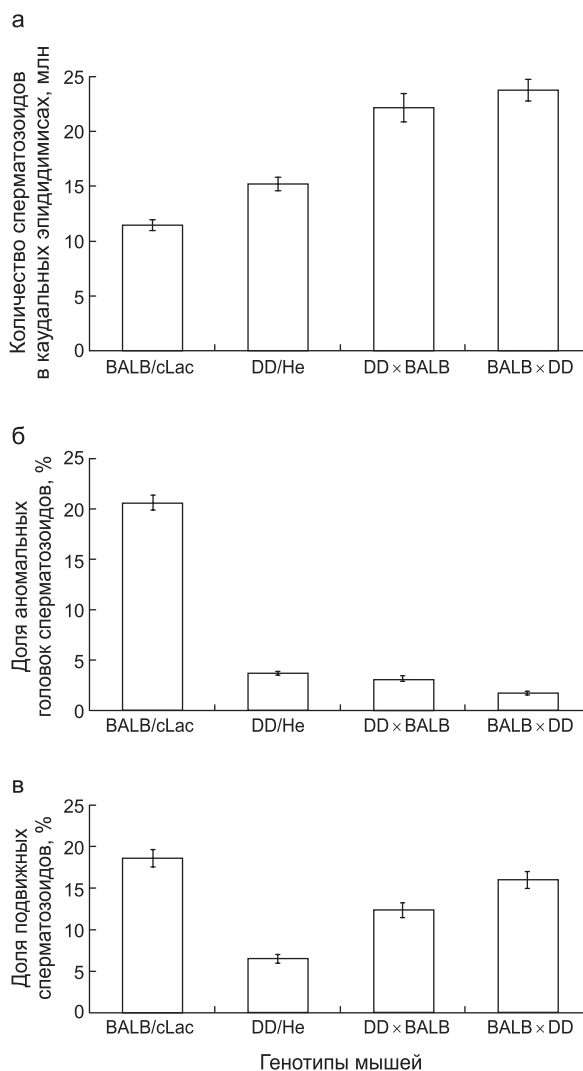
Доля аномальных головок сперматозоидов (рис., в) у самцов гибридов BALB × DD была достоверно ниже, чем у самцов инбредных линий ( $p < 0,01$ , Duncan's test). Доля аномальных головок сперматозоидов у гибридов DD × BALB не отличалась от таковой у самцов линий DD/He, но была достоверно ниже, чем у самцов линии BALB/cLac. Доля аномальных головок у самцов DD × BALB была достоверно выше, чем у самцов BALB × DD ( $p < 0,05$ , Duncan's test).

## ОБСУЖДЕНИЕ

В результате настоящего исследования установлена существенная генетическая изменчивость у самцов лабораторных мышей по количеству сперматозоидов в каудальных эпидидимисах, доле подвижных и атипичных сперматозоидов, т. е. по ключевым показателям параметров сперматогенеза, определяющим их фертильность.

Доля аномальных головок сперматозоидов у самцов линии BALB/cLac была в 5 раз выше, чем у самцов линии DD/He, а доля подвижных сперматозоидов у самцов линии DD/He была почти в 3 раза ниже, чем у самцов линии BALB/cLac. Эти результаты соответствуют ранее полученным данным относительно особенностей сперматогенеза у животных линии BALB/cLac и DD/He (Kishikawa *et al.*, 1999; Осадчук и др., 2012).

Самцы реципрокных гибридов обладали большей массой тела и семенников по сравнению с самцами инбредных линий. Кроме того, количество сперматозоидов у животных обоих реципрокных кроссов было почти в два раза выше, чем у животных исходных инбредных линий. Реципрокные гибриды характеризовались меньшей долей аномальных головок сперматозоидов по сравнению с самцами родительских инбредных линий. Таким образом, самцы реципрокных гибридов характеризуются лучшим



**Рис.** Количество сперматозоидов в каудальном отделе эпидидимиса (а), доля аномальных головок сперматозоидов (б) и доля подвижных сперматозоидов (в) у самцов мышей инбредных линий DD/He и BALB/cLac и их F<sub>1</sub> реципрокных кроссов. Количество животных в группе варьировало от 25 до 32.

качеством спермы по сравнению с животными родительских инбредных линий. Уже давно известно, что при скрещивании животных или растений двух инбредных линий гибриды F<sub>1</sub> более жизнеспособны, имеют большую массу тела, быстрее растут, оставляют больше потомков по сравнению с родительскими линиями (эффект гетерозиса) (Chen, 2010; Hannon *et al.*, 2011). Результаты настоящего исследования показывают, что эффект гетерозиса может проявляться в отношении количества и качества сперматозоидов. Поскольку количество спер-

матозоидов является ключевым показателем, определяющим оплодотворяющую способность спермы (Guzick *et al.*, 2001), то можно предположить, что повышение спермопродукции у гибридов F<sub>1</sub> играет существенную роль в повышении их плодовитости.

Результаты исследования качества сперматозоидов у самцов F<sub>1</sub> реципрокных гибридов двух контрастных по подвижности сперматозоидов линий не подтвердили гипотезу об однозначной связи возможных мутаций генов, лежащих на Y-хромосоме, с низкой подвижностью сперматозоидов у самцов линии DD/He. По доле подвижных сперматозоидов реципрокные гибриды занимали промежуточное положение между линиями BALB/cLac и DD/He, что может свидетельствовать об аддитивных аутосомных эффектах на данный признак. Оказалось, что доля подвижных сперматозоидов у самцов F<sub>1</sub> – потомков матерей линии – BALB была существенно выше, чем у самцов – потомков матерей линии DD, что может говорить о вкладе генов (гена) X-хромосомы в формирование этого признака. Нельзя также исключить влияние других материнских факторов: цитоплазматической наследственности, пре- и постнатальных материнских эффектов.

Доля аномальных головок сперматозоидов у F<sub>1</sub> потомков отцов линии BALB/cLac была выше, чем у F<sub>1</sub> потомков отцов линии DD/He. Это позволяет сделать предположение о существенном влиянии отцовского генотипа (генов Y-хромосомы) на долю аномальных головок сперматозоидов. Влияние отцовского генотипа отмечено также и в отношении массы семенников. Масса семенников у самцов гибридов BALB × DD была достоверно выше, чем у самцов DD × BALB.

Полученные результаты позволяют предположить, что показатели сперматогенеза у реципрокных гибридов линий BALB/cLac и DD/He детерминируются большим числом генов, принадлежащих как отцовскому, так и материнскому генам. Отмечено существенное влияние отцовского генотипа на долю атипичных головок сперматозоидов и массу семенников, что позволяет предположить наличие генов (гена) на Y-хромосоме, контролирующих эти признаки. Обнаружены материнские эффекты на долю подвижных сперматозоидов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 09-04-00930).

## ЛИТЕРАТУРА

- Даев Е.В., Дукельская А.В. Индукция аномалий спермиевых головок у половозрелых самцов мышей линии СВА феромоном самок мышей 2,5-диметилпиразином // Генетика. 2003. Т. 39. № 7. С. 969–974.
- Осадчук А.В., Науменко Е.В. Генетико-эндокринные и этологические механизмы дифференциального размножения. Сообщение I. Сравнительно-генетический анализ базального уровня тестостерона в плазме крови, относительной массе семенников и придаточных половых желез у самцов лабораторных мышей // Генетика. 1983. Т. 19. № 8. С. 1265–1273.
- Осадчук Л.В., Тупикин А.Е., Морозов И.В. и др. Фенотипическая вариабельность сперматогенеза и поиск ассоциаций с генным полиморфизмом у мышей 13 инбредных линий // Генетика. 2012. Т. 48. № 7. С. 1–9.
- Adham I.M., Eck T.J., Mierau K. *et al.* Reduction of spermatogenesis but not fertility in Creb3l4-deficient mice // Mol. Cell. Biol. 2005. V. 25. P. 7657–7664.
- Chen J.C. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor // Trends Plant Sci. 2010. V. 15. P. 1–28.
- Delbridge M.L., Graves J.M. Mammalian Y chromosome evolution and the male-specific functions of Y chromosome-borne genes // Rev. Reprod. 1999. V. 4. P. 101–109.
- Hannon R.M., Meek H.T., Acosta W., Maciel R.C. Sex-specific heterosis in line crosses of mice selectively bred for high locomotor activity // Behav. Genet. 2011. V. 41. P. 615–624.
- Harley V.R., Clarkson M.J., Argentaro A. The molecular action and regulation of the testis-determining factors SRY (sex-determining region on the Y chromosome) and SOX9 [SRY-related high-mobility group (HMG) box 9] // Endocr. Rev. 2003. V. 24. P. 466–487.
- Guzick D., Overstreet J., Factor-Litvak P. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men // N. Engl. J. Med. 2001. V. 345. P. 1388.
- Zheng F., Yang P.J. Regulation of male fertility by X-linked genes // J. Androl. 2010. V. 31. P. 79–84.
- Kashimada K., Koopman P. Sry: the master switch in mammalian sex determination // Development. 2010. V. 137. P. 3921–3930.
- Kishikawa H., Tateno H., Yanagimachi R. Chromosome analysis of BALB/c mouse spermatozoa with normal and abnormal head morphology // Biol. Reprod. 1999. V. 61. P. 809–812.
- Krzanowska H., Styrna J., Wabik-Sliz B. Analysis of sperm quality in recombinant inbred mouse strains: correlation of sperm head shape with sperm abnormalities and with the incidence of supplementary spermatozoa in the perivitelline space // J. Reprod. Fertil. 1995. V. 104. P. 347–354.
- Navarro-Costa P., Gonzlves J., Plancha C.E. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility // Hum. Reprod. Update. 2010. V. 16. P. 525–542.

Styrna J., Kilarski W., Krzanowska H. Influence of the CBA genetic background on sperm morphology and fertilization efficiency in mice with a partial Y chromosome deletion // *Reproduction*. 2003. V. 126. P. 579–588.

Verhoeven G., Willems A., Denolet E., Swinnen V. Androgens and spermatogenesis: lessons from transgenic mouse models // *Phil. Trans. R. Soc.* 2010. V. 365. P. 1537–1556.

## SPERMATOGENESIS INDICES IN INBRED STRAINS DD/HE AND BALB/cLAC AND THEIR F<sub>1</sub> RECIPROCAL CROSSES

M.A. Kleshchev, L.V. Osadchuk, A.V. Osadchuk

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia,  
e-mail: losadch@bionet.nsc.ru

### Summary

We have shown that among 13 inbred mice strains males the DD/He strain has the lowest proportion of mobile sperm and moderate sperm count and proportion of abnormal sperm heads. Males of the BALB/cLac strain have the highest proportion of mobile sperm and abnormal sperm heads, but a moderate sperm count. It is known that Y chromosome genes are important for spermatogenesis. Thus, Y chromosome mutations may be responsible for interstrain differences in spermatogenic parameters. Reciprocal cross can be a useful tool to examine the effect of the Y chromosome on sperm count and the proportions of mobile and morphologically abnormal sperm. The sperm count in DD/He males is higher than in BALB/cLac ones, but both crosses show equal values, exceeding those in the paternal strains. Males of cross BALB/cLac × DD/He have a higher proportion of mobile sperm than males of DD/He × BALB/cLac. The greatest proportion of abnormal sperm heads has been recorded in the BALB/cLac strain. The proportions of abnormal sperm heads in the hybrids were small but little different from each other.

**Key words:** inbred mice strains, spermatogenesis, reciprocal cross.