

# Репродуктивные эффекты нокаута гена фактора некроза опухолей (*TNF*) у мышей

С.О. Масленникова<sup>1</sup>, Г.В. Концевая<sup>1</sup>, М.А. Золотых<sup>1</sup>, М.В. Анисимова<sup>1</sup>, Н.А. Феофанова<sup>1</sup>, М.П. Мошкин<sup>1</sup>, С.А. Недоспасов<sup>2, 3</sup>, Л.А. Герлинская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук», Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Институт молекулярной биологии им. Энгельгардта, Москва, Россия

<sup>3</sup> Московский государственный университет им. Ломоносова, Москва, Россия

Фактор некроза опухолей (*TNF*) является мультифункциональным цитокином, который играет важную роль в гомеостазе. При повышенных концентрациях этот цитокин может вызывать различные патофизиологические процессы, в частности негативно влиять и на разные звенья репродуктивного процесса. В физиологических концентрациях *TNF* обеспечивает поддержание баланса между апоптозом и выживаемостью мужских гамет. Широкое применение системной блокировки *TNF* при лечении ряда аутоиммунных заболеваний ставит вопрос о возможных последствиях такой терапии для репродуктивных функций человека. В данной работе у мышей с нокаутом *TNF* (*TNF*<sup>-/-</sup>) были исследованы: поведенческие взаимодействия самцов с самками, сперматогенез, фертильная эффективность самцов и особенности эмбрионального развития потомков. Результаты репродуктивного фенотипирования мышей с нокаутом гена *TNF* показали, что данный цитокин вовлечен в регуляцию полового поведения, сперматогенеза, пре- и постимплантационного развития потомков. Полный генетический нокаут гена *TNF* снижает репродуктивную эффективность мышей, что выражается в меньшем числе жизнеспособных эмбрионов при внутривидовых скрещиваниях особей *TNF*<sup>-/-</sup> по сравнению с таковыми при скрещиваниях животных дикого типа *TNF*<sup>+/+</sup>. Причиной меньшей плодовитости является увеличение доимплантационных эмбриональных потерь при внутривидовых скрещиваниях мышей линии *TNF*<sup>-/-</sup>. В свою очередь доимплантационные потери у самок *TNF*<sup>-/-</sup> могут быть обусловлены азооспермией у самцов этого генотипа. Кроме того, исследованные генотипы различаются по чувствительности репродуктивной функции к стимулирующему влиянию самок. Взаимодействие с самками увеличивало концентрацию сперматозоидов в эпидидимисах самцов обеих генетических линий, причем наиболее выражено – у особей с нокаутом по гену *TNF*, что приводило к увеличению в эпидидимисах незрелых форм сперматозоидов. Полученные данные свидетельствуют о том, что сниженная экспрессия *TNF* может быть одной из причин бесплодия, а также указывают на возможные механизмы этого явления.

Ключевые слова: фактор некроза опухоли (*TNF*); мыши с нокаутом *TNF*; сперматогенез; пре- и постнатальное развитие потомков; половое поведение.

## Reproductive effects of the tumor necrosis factor (*TNF*) deficiency in mice

S.O. Maslennikova<sup>1</sup>, G.V. Kontsevaya<sup>1</sup>, M.A. Zolotykh<sup>1</sup>, M.V. Anisimova<sup>1</sup>, N.A. Feofanova<sup>1</sup>, M.P. Moshkin<sup>1</sup>, S.A. Nedospasov<sup>2, 3</sup>, L.A. Gerlinskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Engelhardt Institute of Molecular Biology Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

<sup>3</sup> Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

*TNF* is a multifunctional cytokine that, at physiological concentrations, maintains the balance between apoptosis and survival of male germ cells and, at higher concentrations, has adverse effects on various stages of the reproductive process. Although anti-cytokine therapies have been used in millions of patients, the consequences of cytokine deficiency for reproductive functions are poorly understood and need attention. In this work, we have studied behavioral interactions between males and females, spermatogenesis, male fertility, and embryonic developmental characteristics of the progeny in *TNF* $\alpha$  knockout mice (*TNF*<sup>-/-</sup>). We have demonstrated that *TNF* is involved in the regulation of sexual behavior, spermatogenesis, pre- and postimplantation development. Complete *TNF* deficiency led to decreased reproductive efficiency: a lower number of viable embryos were observed in *TNF*<sup>-/-</sup> mice than in wild-type mice. The decrease in fertility was caused by preimplantation embryo loss in *TNF*<sup>-/-</sup> mice. Preimplantation loss in females might be caused by asospermia in *TNF*<sup>-/-</sup> males. Additionally, the sensitivity of reproductive functions to female stimuli was different between *TNF*<sup>-/-</sup> mice and wild-type mice, while interactions with females increased the concentrations of spermatozooids in both *TNF*<sup>-/-</sup> and wild-type mice. Still higher levels were observed in knockout animals, which led to increase in the number of immature spermatozooids in epididymides.

Key words: Tumor necrosis factor (*TNF*); *TNF* knockout mice; spermatogenesis; pre- and postnatal development; sexual behavior

### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ?

Масленникова С.О., Концевая Г.В., Золотых М.А., Анисимова М.В., Феофанова Н.А., Мошкин М.П., Недоспасов С.А., Герлинская Л.А. Репродуктивные эффекты нокаута гена фактора некроза опухолей (*TNF*) у мышей. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2015;19(4):404-409. DOI 10.18699/VJ15.052

### HOW TO CITE THIS ARTICLE?

Maslennikova S.O., Kontsevaya G.V., Zolotykh M.A., Anisimova M.V., Feofanova N.A., Moshkin M.P., Nedospasov S.A., Gerlinskaya L.A. Reproductive effects of the tumor necrosis factor (*TNF*) deficiency in mice. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii – Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2015;19(4):404-409. DOI 10.18699/VJ15.052

DOI 10.18699/VJ15.052

УДК 577.175.14

Поступила в редакцию 26.06.2015 г.

Принята к публикации 15.07.2015 г.

© АВТОРЫ, 2015

✉ e-mail: lgerlinskaya@gmail.com

Иммунный ответ на инфекции или иные формы антигенной стимуляции может влиять на многие функции организма, включая процессы воспроизводства (Moshkin et al., 2000). Существенный вклад в это влияние вносят провоспалительные цитокины, в частности фактор некроза опухоли (TNF). В регуляции функции семенников TNF играет двойственную роль. С одной стороны, повышение концентрации этого цитокина в семенниках при воспалительном процессе стимулирует апоптоз (Riccioli et al., 2000; Perdichizzi et al., 2007; Theas et al., 2008). С другой стороны, TNF в физиологических концентрациях обеспечивает поддержание через Fas/Fas L систему баланс апоптоза и выживания клеток семенника (Riccioli et al., 2000; Pentikäinen et al., 2001), а также оказывает прямое положительное влияние на созревание половых клеток (Suominen et al., 2004; Pérez et al., 2013).

Не менее значимым для репродукции является участие TNF в регуляции центральной нервной системы. Так, увеличение концентрации TNF при воспалении или других заболеваниях головного мозга вызывает нейротоксический эффект, и его уровень коррелирует с проявлениями депрессивных симптомов (Perry et al., 2002; Prather et al., 2009; Raison et al., 2010) и агрессивным поведением (Zalcman, Siegel, 2006). Кроме того, активация TNF при воспалении верхних дыхательных путей вносит вклад в формирование обонятельной дисфункции (Sultan et al., 2011), что может существенно влиять на процессы химической коммуникации, играющей важную роль в половом поведении.

В подавляющем большинстве экспериментов и клинических наблюдений рассматриваются репродуктивные эффекты повышенной секреции провоспалительных цитокинов, имеющие место при инфекционных заболеваниях. Вместе с тем при широкой распространенности системной антицитокиновой терапии, в частности при аутоиммунных заболеваниях (Астраханцева и др., 2014; Друцкая и др., 2014), значимость дефицита цитокинов изучена в гораздо меньшей степени. В данной работе у мышей с нокаутом гена *TNF* (TNF<sup>-/-</sup>) были исследованы поведенческие взаимодействия самцов с самками, сперматогенез, фертильная эффективность самцов и особенности эмбрионального развития потомков.

## Материалы и методы

**Животные и условия содержания.** Исследование выполнено в Центре генетических ресурсов лабораторных животных ИЦиГ СО РАН (RFMEFI61914X0005 и RFMEFI62114X0010), технологическая структура которого обеспечивает проведение экспериментов в строго контролируемых условиях среды: фотопериоде 14С:10Т, температуре 22–24 °С и влажности 40–50 %. Опыты выполнены на мышах линий TNF<sup>-/-</sup> с полной делецией гена *TNF*, свободных от видоспецифических патогенов (specific pathogen free – SPF), полученных с помощью технологии эмбриональных стволовых клеток и переведенных на генетическую основу C57BL/6 путем возвратного скрещивания (Grivennikov et al., 2005). В качестве контрольной группы (дикий тип) были использованы лабораторные мыши линии C57BL/6, которые обозначены далее как TNF<sup>+/+</sup>. Самцы в возрасте 8–10 нед были рассажены

в клетки (OptiMice) по одному за 5 дней до начала эксперимента. Самок содержали в тех же условиях по 5 особей в клетке. Корм (SNIFF, Германия) и воду давали *ad libitum*. Корм и обеспыленную подстилку предоставляли животным после автоклавирования. Всего для исследования морфологии семенников, числа и подвижности сперматозоидов у самцов, содержащихся изолированно, было использовано по 8 особей каждой линии. При анализе полового поведения, эффективности покрытий и изменений после содержания с самками морфологии семенников и показателей сперматогенеза было исследовано 8 самцов и 16 самок TNF<sup>-/-</sup>, а также 8 самцов и 16 самок TNF<sup>+/+</sup>. Протокол эксперимента был рассмотрен и одобрен комиссией по биоэтике ФИЦ ИЦиГ СО РАН.

**Половое поведение.** В клетку самца после отключения света (15 ч местного времени) подсаживали двух самок и в течение 10 мин вели видеозапись их поведенческих взаимодействий.

**Спаривание.** В первый день эксперимента к каждому самцу линий TNF<sup>-/-</sup> и TNF<sup>+/+</sup> сразу после отключения света подсаживали по 2 виргинные самки и содержали совместно в течение 5 сут. На следующее утро (9–10 ч) и далее ежедневно до окончания периода совместного содержания самок осматривали на наличие вагинальной пробки. При обнаружении таковой самок отсаживали в отдельные клетки. День отсадки считали нулевым днем беременности. По окончании периода спариваний самок, не покрытых самцами, отсаживали в индивидуальные клетки и содержали не менее 3 нед для регистрации родов. Самцов декапитировали для взятия семенников и эпидидимисов.

**Сперматозоиды.** После декапитации у самцов извлекали эпидидимис и помещали в 500 мкл солевого раствора Хенкса без кальция и магния (Sigma) при +37 °С. Каудальный отдел эпидидимиса измельчали и помещали в инкубатор при +37 °С на 20 мин. Полученную суспензию фильтровали через капроновый фильтр и 15 мкл помещали на предметное стекло 2-cell chamber (80 мкм). Для определения количества и подвижности сперматозоидов использовали автоматический анализатор спермы (Mouse Trax – Hamilton Thorne). В каждом образце было исследовано 5 полей при увеличении ×4. Все процедуры проводили при +37 °С.

**Морфология семенников.** Семенники фиксировали в нейтральном 10 %-м формалине. Фиксированные образцы обезжизняли последовательным проведением их через спирт в возрастающей концентрации и ксилол (Thermo Scientific, Великобритания). Заливку парафиновых блоков проводили на заливочной станции HistoStar (Thermo Scientific, Великобритания). Для приготовления срезов толщиной 3 мкм использовали ротационный полуавтоматический микротом Microm HM 340E (ThermoScientific, Великобритания). Срезы освобождали от парафина, окрашивали гематоксилином Эрлиха и эозином (Волкова, Елецкий, 1982).

Подсчет сперматогоний, сперматоцитов и сперматид I порядка производили в 15 произвольно выбранных поперечных срезах извитых канальцев. Данные по подсчету клеток каждого типа были усреднены по каждому семеннику.

**Беременность и развитие зародышей.** Самок декапитировали на 16-е сут беременности и взвешивали эмбрионы и их плаценты. Для оценки репродуктивных характеристик подсчитывали количество овулировавших яйцеклеток (число желтых тел), общее число эмбрионов (число мест имплантации) и число живых эмбрионов без видимых признаков нарушений развития.

**Статистика.** Для определения влияния генотипа и условий содержания на морфофункциональные характеристики гонад использовали двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA, main effects). При сравнении двух средних применяли *t*-критерий Стьюдента. Показатели плодовитости и эмбриональных потерь сравнивали на основе критерия  $\chi^2$ . Взаимозависимость массы и числа эмбрионов оценивали с помощью коэффициента линейной корреляции. Результаты представлены как средняя  $\pm$  ошибка средней.

## Результаты

**Половое поведение.** Анализ поведенческих актов, проявляемых самцами при подсадке самок, показал, что самцы линии TNF<sup>-/-</sup> тратят существенно меньше времени на назо-генитальные обнюхивания по сравнению с самцами TNF<sup>+/+</sup> (рис. 1). Вместе с тем продолжительность назо-назальных обнюхиваний была одинаковой у мышей обеих линий. По другим формам полового поведения также не выявлено статистически значимых различий между линиями TNF<sup>+/+</sup> и TNF<sup>-/-</sup> (данные не приведены).

**Семенники и эпидидимисы.** Двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA, main effects) показал, что

на индексы семенников и эпидидимисов значимо влияли генотип самцов ( $F_{1,29} = 33,42, p < 0,001$ ;  $F_{1,29} = 14,83, p < 0,001$  соответственно) и условия их содержания перед взятием материала ( $F_{1,29} = 12,72, p < 0,001$ ;  $F_{1,29} = 26,27, p < 0,001$  соответственно). При этом самцы линии TNF<sup>-/-</sup> имели большие значения индекса семенников ( $6,99 \pm 0,13$ ) и индекса эпидидимисов ( $1,67 \pm 0,10$ ) по сравнению с самцами TNF<sup>+/+</sup> ( $6,85 \pm 0,19$  и  $1,34 \pm 0,06$ ). После содержания с самками оба показателя возрастали у самцов линии TNF<sup>+/+</sup>. У линии TNF<sup>-/-</sup> это увеличение было статистически значимым только для индекса эпидидимисов (табл. 1).

**Сперматозоиды.** Генотип самца и условия его содержания перед взятием образцов семени существенно влияли на основные характеристики сперматозоидов (табл. 2). Концентрация сперматозоидов в эпидидимисах самцов дикого типа TNF<sup>+/+</sup> ( $112,6 \pm 22,7$  млн/мл) более чем в два раза превышала таковую у самцов TNF<sup>-/-</sup> ( $49,8 \pm 10,4$  млн/мл, табл. 2). При этом содержание с самками увеличивало количество сперматозоидов в эпидидимисах, прежде всего, у самцов с нокаутом TNF, у которых накопление сперматозоидов сочеталось со статистически значимым увеличением скорости их перемещения (табл. 3). Сперматозоиды мышей линии TNF<sup>+/+</sup> отличались от таковых у линии TNF<sup>-/-</sup> меньшей вытянутостью ( $56,7 \pm 2,6$  и  $61,9 \pm 2,8$  соответственно), но большими размерами ( $6,89 \pm 0,61$  и  $4,74 \pm 0,48$  соответственно) головки (табл. 2). Содержание с самками влияло на форму и размеры головок сперматозоидов (табл. 2). У самцов обеих генетических линий головки имели бо-

**Таблица 1.** Индексы семенников и эпидидимисов

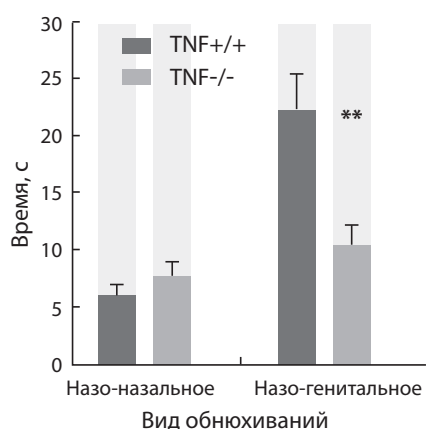
Линия	Индекс семенников, мг/г <i>n</i> = 8	Индекс эпидидимисов, мг/г <i>n</i> = 8
Содержание изолированное		
TNF <sup>+/+</sup>	$5,32 \pm 0,21$	$1,14 \pm 0,04$
TNF <sup>-/-</sup>	$6,83 \pm 0,15$	$1,43 \pm 0,04$
Содержание с самками		
TNF <sup>+/+</sup>	$6,39 \pm 0,17^{***}$	$1,53 \pm 0,07^{***}$
TNF <sup>-/-</sup>	$7,16 \pm 0,20$	$1,92 \pm 0,15^{**}$

\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с самцами той же линии, содержащимися изолированно от самок (*t*-тест Стьюдента).

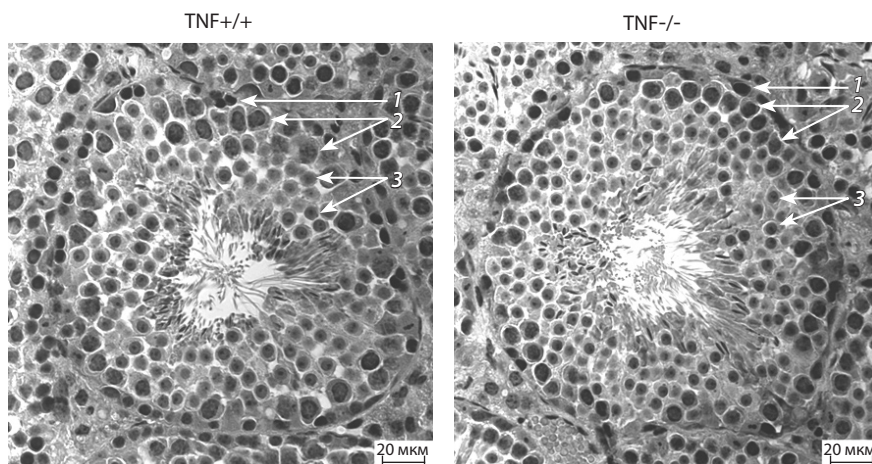
**Таблица 2.** Влияние генотипа и условий содержания на основные характеристики сперматозоидов

Признак	Факторы	$F_{1,29}$	<i>p</i>
Концентрация сперматозоидов	Генотип	6,95	= 0,01
	Условия содержания	3,90	= 0,057
Скорость движения	Генотип	0,33	= 0,57
	Условия содержания	15,78	< 0,001
Элонгация (вытянутость) головки	Генотип	4,14	= 0,05
	Условия содержания	39,69	< 0,001
Размер головки	Генотип	16,23	< 0,001
	Условия содержания	35,12	< 0,001





**Рис. 1.** Продолжительность назо-назальных и назо-генитальных обнюхиваний при взаимодействии самцов и самок линий TNF+/+ и TNF-/. \*\*  $p < 0,01$  (*t*-тест Стьюдента).



**Рис. 2.** Гистологический анализ семенников TNF+/+ и TNF-/. Срезы ткани окрашены гематоксилином и эозином. Стадии развития сперматозоидов в семенных канальцах: 1 – сперматогонии; 2 – сперматоциты; 3 – сперматиды I порядка.

Срезы ткани окрашены гематоксилином и эозином. Стадии развития сперматозоидов в семенных канальцах: 1 – сперматогонии; 2 – сперматоциты; 3 – сперматиды I порядка.

**Таблица 3.** Морфофункциональные характеристики сперматозоидов

Линия	Концентрация, млн/мл $n = 8$	Скорость, мкм/сек (VCL) $n = 8$	Элонгация головки $n = 8$	Размер головки, мкм <sup>2</sup> $n = 8$
Содержание изолированное				
TNF+/+	104,6 ± 43,39	66,3 ± 6,04	62,0 ± 4,62	5,49 ± 0,96
TNF-/-	10,7 ± 2,28	56,3 ± 3,35	72,7 ± 0,53	2,97 ± 0,17
Содержание с самками				
TNF+/+	120,6 ± 17,53	75,8 ± 3,99	51,5 ± 0,62*	8,29 ± 0,39*
TNF-/-	88,9 ± 4,35***	80,9 ± 2,10***	51,1 ± 0,69***	6,50 ± 0,22***

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  по сравнению с самцами той же линии, содержавшимися изолированно от самок (*t*-тест Стьюдента).

лее округлую форму (снижение элонгации) и большие размеры (табл. 3).

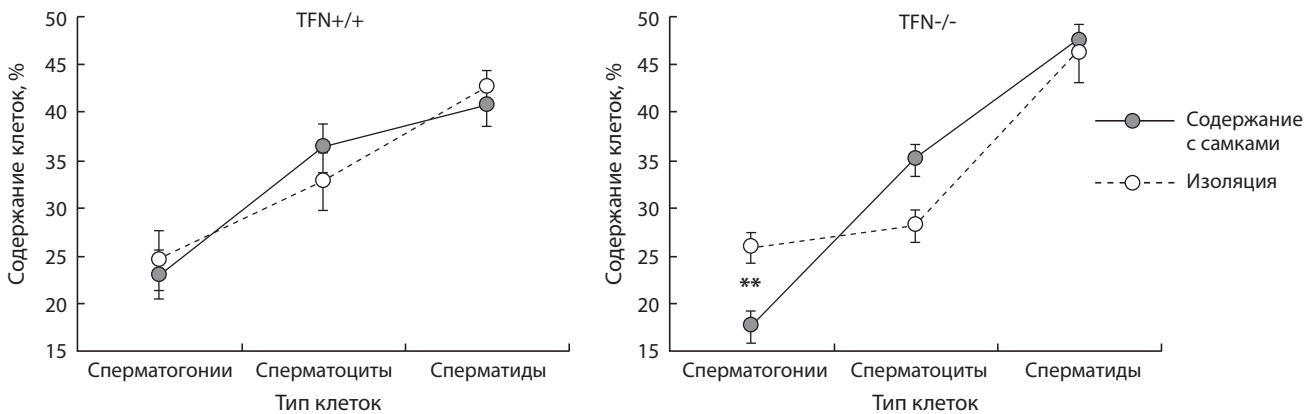
**Гистология семенников.** На препаратах семенников выделяли три типа различающихся по степени зрелости сперматогенных клеток – сперматогонии, сперматоциты и сперматиды (рис. 2). Их относительное число существенно не различалось у самцов TNF+/+ и TNF-/. Но у самцов с нокаутом по *TNF* было выявлено существенное сокращение относительного числа сперматогониев после их 5-суточного содержания с самками по сравнению с таковым при изолированном содержании (рис. 3).

**Фертильные покрытия.** Критерием фертильного покрытия являлось наличие у самок овулировавших яйцеклеток или факта родов после отсадки в конце эксперимента. Самцы линии TNF+/+ покрыли 14 самок из 16, а самцы TNF-/- – 13 из 16. Несмотря на одинаковую эффективность фертильных покрытий, общее число живых эмбрионов у мышей, дефицитных по *TNF*, было существенно меньше, чем у мышей дикого типа – 56 и 87 соответственно,  $\chi^2 = 4,09$ ;  $p = 0,043$ . Причиной меньшей плодовитости мышей линии TNF-/- были большие доимплантационные и общие эмбриональные потери по сравнению с линией TNF+/+ (рис. 4).

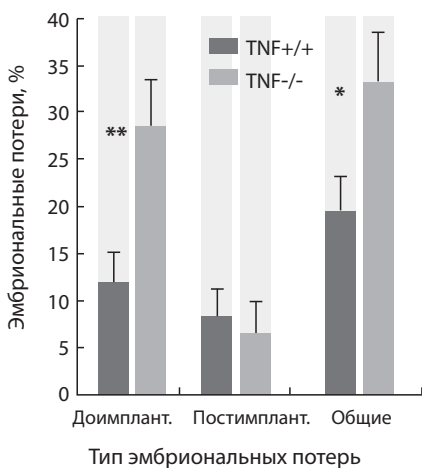
**Масса эмбрионов.** Масса вынашиваемых эмбрионов была выше у самок TNF-/- (637,7 ± 6,6 мг) по сравнению с таковой (601,7 ± 7,3 мг) у самок TNF+/+ ( $p < 0,001$ ). Анализ взаимозависимости числа вынашиваемых эмбрионов и их массы показал, что общепринятая отрицательная корреляция между этими признаками соблюдается на уровне тенденции только у мышей дикого типа TNF+/+ ( $r = -0,22$ ,  $p = 0,06$ ). У беременных самок с нокаутом *TNF*, наоборот, выявлена статистически значимая положительная корреляция числа эмбрионов и их массы ( $r = -0,40$ ,  $p = 0,002$ ). В результате при многоплодной беременности (8–9 зародышей) масса эмбрионов TNF-/- превосходила таковую эмбрионов TNF+/+ (рис. 5).

### Обсуждение

Как следует из наших данных, полный нокаут гена *TNF* снижает репродуктивную эффективность мышей, что выражается в сокращении числа жизнеспособных эмбрионов при внутрилинейных скрещиваниях особей TNF-/- по сравнению со скрещиваниями животных дикого типа (TNF+/+). Различная продуктивность млекопитающих определяется их конкурентными преимуществами на разных стадиях репродуктивного цикла, начиная от вы-



**Рис. 3.** Относительное содержание сперматогенных клеток в семенниках самцов мышей разных линий при содержании в изоляции или с половозрелыми самками. \*\*  $p < 0,01$  при сравнении между группами изолированного содержания и содержания с самками (*t*-тест Стьюдента).



**Рис. 4.** Эмбриональные потери при внутривидовых скрещиваниях мышей линий *TNF*<sup>+/+</sup> и *TNF*<sup>-/-</sup>. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  при сравнении линий (критерий  $\chi^2$ ).

бора партнера и до выкармливания потомков. Несмотря на пониженный интерес к половому партнеру, индикатором которого служит продолжительность обнюхивания генитальной области, самцы с дефицитом *TNF* покрыли 81,2 % подсаженных к ним самок, что практически не отличается от фертильных покрытий, зарегистрированных у мышей дикого типа (87,5 %). Но у самок *TNF*<sup>-/-</sup> были зафиксированы значительно большие по сравнению с самками дикого типа эмбриональные потери, особенно на доимплантационной стадии развития.

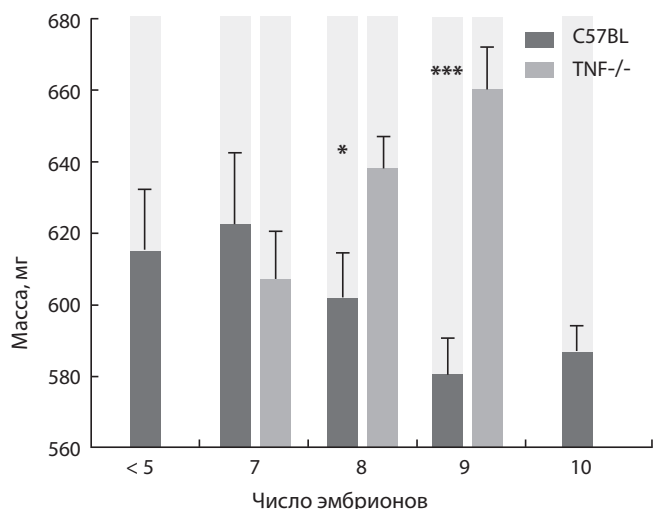
Доимплантационная гибель зародышей относится к числу ведущих причин бесплодия. На ее величину существенно влияют количественные

(азоспермия) и качественные характеристики сперматозоидов (Bulletti et al., 1996; Wosnitzer et al., 2014). Средняя концентрация сперматозоидов в эпидидимисах самцов *TNF*<sup>-/-</sup> до подсадки самок была почти в 10 раз меньше, чем у самцов *TNF*<sup>+/+</sup>. Взаимодействие самцов с самками увеличивало концентрацию сперматозоидов в эпидидимисах самцов обеих генетических линий, причем рост концентрации сперматозоидов был наиболее выраженным у самцов с нокаутом по гену *TNF*. Поскольку продолжительность совместного содержания с самками составляла всего 5 сут, что при более чем 2-недельном цикле гаметогенеза совершенно недостаточно для обогащения эпидидимисов вновь образованными сперматозоидами, то увеличение их концентрации в эпидидимисах можно объяснить ускоренным выходом из извитых канальцев менее зрелых гамет. В пользу этого предположения свидетельствует увеличение при содержании самцов с самками скорости движения сперматозоидов, которое было наиболее выраженным и статистически значимым у *TNF*<sup>-/-</sup> самцов. Кроме того, у этих же самцов взаимодействие с самками ускоряло переход от незрелых к более зрелым формам сперматогенных клеток и выразилось в статистически значимом снижении доли сперматогониев. Еще одно доказательство накопления в эпидидимисах менее зрелых сперматозоидов дает анализ формы головки, которая в образцах семени, взятых после взаимодействия с самками, характеризовалась меньшей вытянутостью при большей площади максимального сечения. Оба признака характерны для менее зрелых форм сперматозоидов (Agarwal et al., 2003; Ramyn et al., 2013).

Следует отметить, что существенное снижение концентрации сперматозоидов при нокауте гена *TNF* отмечено также Suh с соавт. (2008), которое авторы объясняют значительным падением концентрации тестостерона и уменьшением экспрессии в семенниках генов, вовлеченных в процессы стероидогенеза. Как известно, тестостерон инициирует и поддерживает сперматогенез (Holdcraft, Braun, 2004). Более того, при низком уровне тестостерона в семенниках уменьшается элонгация сперматид, что свидетельствует о подавлении процессов созревания (McLachlan et al., 1994).

Итак, причиной значительной доимплантационной гибели эмбрионов при внутривидовых скрещиваниях мышей с дефицитом *TNF* может быть азоспермия, наблюдаемая у самцов *TNF*<sup>-/-</sup> до подсадки к ним самок, а также увеличение доли незрелых форм сперматозоидов, которое отмечается после подсадки к этим самцам половозрелых самок.

Снижение плодовитости у *TNF*-мутантных мышей сочеталось с увеличением массы эмбрионов. Этот эффект не является простым следствием увеличения массы зародышей при уменьшении их числа, поскольку статистически значимые различия между линиями *TNF*<sup>-/-</sup> и *TNF*<sup>+/+</sup> имели место, прежде всего, при многоплодной беременности. Механизмы, обуславливающие большую массу эмбрионов, при дефиците *TNF* требуют специального изучения. Сегодня можно отметить лишь то, что повышенная экспрессия данного цитокина



**Рис. 5.** Масса эмбрионов у самок линий TNF<sup>+/+</sup> и TNF<sup>-/-</sup>, вынашивающих разное число зародышей.

\*  $p < 0,05$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  (t-тест Стьюдента).

может усиливать процессы апоптоза, тормозящие рост эмбрионов (Wride, Sanders, 1995).

Таким образом, репродуктивное фенотипирование мышей с нокаутом гена *TNF* показывает, что данный цитокин вовлечен в регуляцию полового поведения, сперматогенеза, пре- и постимплантационного развития эмбрионов. Наши данные должны быть учтены при назначении длительной анти-TNF терапии пациентам, находящимся в репродуктивном возрасте.

### Благодарности

Работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (Соглашение № 14.621.21.0010 о предоставлении субсидии от 04.12.2014 г. (RFMEFI62114X0010) и Соглашение о предоставлении субсидии № 14.619.21.0005 от 22.08.2014 г. (RFMEFI61914X0005)), гранта РФФИ № 14-04-32144 и программы «Молекулярная и клеточная биология» Президиума РАН.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### Список литературы

- Астраханцева И.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Круглов А.А., Недоспасов С.А. Современная антицитокиновая терапия аутоиммунных заболеваний. *Биохимия*. 2014;12:1605-1616.
- Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. М.: Медицина, 1982.
- Друцкая М.С., Ефимов Г.А., Зварцев Р.В., Чашина А.А., Чудаков Д.М., Тиллиб С.В., Круглов А.А., Недоспасов С.А. Экспериментальные модели артрита, патогенез которых связан с экспрессией фактора некроза опухолей (TNF). *Биохимия*. 2014;12:1648-1656.
- Agarwal A., Sharma R.K., Nelson D.R. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. *J. Androl.* 2003;24(3):343-352.

- Bulletti C., Flamigni C., Giacomucci E. Reproductive failure due to spontaneous abortion and recurrent miscarriage. *Hum. Reprod. Update*. 1996;2(2):P.118-136.
- Grivennikov S.I., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Kruglov A.A., Marakusha B.I., Shakhov A.N., Murakami T., Drutsкая L.N., Förster I., Clausen B.E., Tessarollo L., Ryffel B., Kuprash D.V., Nedospasov S.A. **Distinct and nonredundant *in vivo* functions of TNF produced by t cells and macrophages/neutrophils: protective and deleterious effects.** *Immunity*. 2005;22(1):93-104.
- Holdcraft R.W., Braun R.E. Hormonal regulation of spermatogenesis. *Intern. J. Androl.* 2004;27:335-342.
- McLachlan R.I., Wreford N.G., Meachem S.J., De Kretser D.M., Robertson D.M. **Effects of testosterone on spermatogenic cell populations in the adult rat.** *Biol. Reprod.* 1994;51(5):945-955.
- Moshkin M.P., Gerlinskaya L.A., Evsikov V.I. The role of the immune system in behavioural strategies of reproduction. *J. Reprod. Dev.* 2000;46:341-365.
- Pentikäinen V., Erkkilä K., Suomalainen L., Ojala M., Pentikäinen M.O., Parvinen M., Dunkel L. TNF alpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2001;86(9):4480-4488
- Perdichizzi A., Nicoletti F., La Vignera S., Barone N., D'Agata R., Vicari E., Calogero A. Effects of tumour necrosis factor- $\alpha$  on human sperm motility and apoptosis. *J. Clin. Immunol.* 2007;27:341-365.
- Pérez C.V., Theas M.S., Jacobo P.V., Jarazo-Dietrich S., Guazzone V.A., Lustig L. Dual role of immune cells in the testis. *Spermatogenesis*. 2013;3(1):e23870. DOI: 10.4161
- Perry G., Cash A.D., Smith M.A. Alzheimer disease and oxidative stress. *J. Biomed. Biotechnol.* 2002;2(3):120-123.
- Prather A.A., Rabinovitz M., Pollock B.G., Lotrich F.E. Cytokine-induced depression during IFN- $\alpha$  treatment: the role of IL-6 and sleep quality. *Brain Behav. Immun.* 2009;23(8):1109-1116. DOI: 10.1016/j.bbi.2009
- Raison C.L., Rye D.B., Woolwine B.J., Vogt G.J., Bautista B.M., Spivey J.R., Miller A.H. Chronic interferon-alpha administration disrupts sleep continuity and depth in patients with hepatitis C: association with fatigue, motor slowing, and increased evening cortisol. *Biol. Psychiatry*. 2010;15(10):942-949. DOI: 10.1016/j.biopsych.2010
- Ramón M., Soler A.J., Ortiz J.A., García-Alvarez O., Maroto-Morales A., Roldan E.R.S., Garde J.J. Sperm population structure and male fertility. *Biol. Reprod.* 2013;7(89):110.
- Riccioli A., Starace D., D'Alessio A., Starace G., Padula F., De Cesaris P., Filippini A., Ziparo E. TNF-alpha and IFN-gamma regulate expression and function of the Fas system in the seminiferous epithelium. *J. Immunol.* 2000;15(165):743-749.
- Suh J.H., Gong E.Y., Hong C.Y., Park E., Ahn R.S., Park K.S., Lee K. Reduced testicular steroidogenesis in tumor necrosis factor-alpha knockout mice. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2008;112(1/3):117-121.
- Sultan B., May L.A., Lane A. P. The role of TNF- $\alpha$  in inflammatory olfactory loss. *Laryngoscope*. 2011;121(11):2481-2486.
- Suominen J.S., Wang Y., Kaipia A., Toppari J. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) promotes cell survival during spermatogenesis, and this effect can be blocked by infliximab, a TNF-alpha antagonist. *Eur. J. Endocrinol.* 2004;151(5):629-640.
- Theas M.S., Rival C., Jarazo-Dietrich S., Jacobo P., Guazzone V.A., Lustig L. Tumour necrosis factor- $\alpha$  released by testicular macrophages induces apoptosis of germ cells in autoimmune orchitis. *Hum. Reprod.* 2008;23(8):1865-1872.
- Wosnitzer M., Goldstein M., Hardy M.P. **Review of Azoospermia.** *Spermatogenesis*. 2014;31(4):e28218.
- Wride M.A., Sanders E.J. Potential roles for tumour necrosis factor alpha during embryonic development. *Anat. Embryol. (Berl)*. 1995;191(1):1-10.
- Zalman S.S., Siegel A. **The neurobiology of aggression and rage: role of cytokines.** *Brain Behav. Immun.* 2006;20(6):507-514.