

УДК 591.3:612.617.1:611.631.3:577.175.624:599.323.41

ОСОБЕННОСТИ РОСТА И РАЗВИТИЯ СЕМЕННИКОВ В ПОСТПУБЕРТАТНОМ ПЕРИОДЕ У МЫШЕЙ ИНБРЕДНЫХ ЛИНИЙ РТ И СВА/Лас

© 2012 г. Н. В. Гуторова, М. А. Клещёв, Л. В. Осадчук

Институт цитологии и генетики СО РАН

630090 Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева, д. 10

E-mail: losadch@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 27.07.11 г.

Окончательный вариант получен 26.01.12 г.

Цель настоящего исследования состояла в сравнительно-генетическом анализе развития семенников в постпубертатный период (с 70 по 90 день жизни) у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас. Анализировали межлинейные различия по массе тела, семенников, уровню тестостерона в сыворотке периферической крови, количеству эпидидимальных сперматозоидов, площади семенного эпителия, просвета семенного канальца и островков клеток Лейдига. Обнаружено, что морфологические и гистоморфометрические параметры семенников у самцов линии РТ, в отличие от СВА/Лас, не достигали дефинитивного уровня с окончанием пубертатного периода, а продолжали увеличиваться до 90 дня жизни. Таким образом, у лабораторных мышей генетические различия в тестикулярном развитии продолжают формироваться в постпубертатный период.

Ключевые слова: онтогенез, морфометрия семенного канальца, клетки Лейдига, тестостерон, сперматозоиды, инбредные линии мышей.

Семенник млекопитающих является сложным органом, состоящим из семенных канальцев и интерстициальной ткани, которые соответственно продуцируют сперматозоиды и гормоны (Nel-Themaat et al., 2010). В семеннике можно выделить три важнейших типа клеток: половые клетки на разных стадиях развития, клетки Сертоли и Лейдига. Клетки Сертоли играют существенную роль в детерминации мужского пола и в поддержании сперматогенеза во взрослой жизни. Их пролиферация и дифференциация продолжается до начала половой зрелости, когда они прекращают делиться и начинают “выращивать” половые клетки (Petersen, Söder, 2006). Постнатальная дифференциация клеток Лейдига начинается у мышей приблизительно на 10-й день жизни. Формирование дефинитивной (“взрослой”) популяции клеток Лейдига включает несколько стадий: развитие клеток-предшественников (14–28 день жизни), формирование незрелых (28–56 день жизни) и “взрослых” клеток Лейдига (56 день жизни и далее) (Mendis-Handagama, Ariyaratne, 2001). Это отражается в изменении продукции тестостерона семенниками, а на гистологическом уровне может сопровождаться характерными изменениями морфометрических параметров.

В наших предыдущих исследованиях были обнаружены достоверные межлинейные различия по сперматогенной функции у взрослых самцов

мышей инбредных линий (Осадчук, 2010). При этом наиболее контрастными по гормональному потенциалу семенников оказались линии РТ и СВА/Лас (Дубовенко, Осадчук, 2010). Цель настоящей работы – установить межлинейные различия в стероидогенной и сперматогенной активности семенников в процессе постпубертатного развития у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас, используя классический гистологический подход и традиционные физиологические методы оценки функциональной активности. В задачи исследования входило: провести морфометрический анализ гистологических препаратов поперечных срезов семенников; измерить уровень тестостерона в сыворотке крови; определить количество эпидидимальных сперматозоидов у самцов мышей в постпубертатный период онтогенеза; выявить межлинейные различия в гистоморфометрических, гормональных и сперматогенных параметрах.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Условия эксперимента. Для исследования были взяты самцы ($n = 64$) двух инбредных линий РТ и СВА/Лас в возрасте 70, 80 и 90 дней, не имевшие сексуального опыта. Репродуктивные клетки формировали из трех самок и одного самца в возрасте 60 дней. Самок на последней неделе бере-

менности отсаживали в отдельные клетки, день родов считали первым днем жизни их потомства. Через неделю после родов число детенышей в помете корректировали до 4–7. Мышей выращивали в стандартных условиях вивария Института цитологии и генетики СО РАН при фиксированном световом режиме 12 ч/12 ч (день-ночь, соответственно) и температуре +22°C, воду и корм животные получали без ограничений. Молодняк отсаживали от матерей в возрасте 30 дней. Группы самцов одного возраста и одной и той же линии формировали из нескольких пометов, размер групп составлял 4–6 животных. Для снятия эффекта группового содержания, животных за 4 дня перед декапитацией отсаживали в индивидуальные клетки (изоляция). Перед отсадкой на изоляцию и декапитацией животных взвешивали. Из эксперимента самцов мышей выводили с соблюдением правил гуманного обращения с животными. Самцов декапитировали, собирали кровь, семенники извлекали и взвешивали. Сперматозоиды выделяли из каудальных эпидидимисов, помещали в раствор фосфатного буфера и окрашивали эозином согласно описанной ранее методике (Осадчук, 2010). Подсчет сперматозоидов производили в камере Горяева при увеличении $\times 200$.

Гистоморфометрический анализ поперечных срезов семенников. Один семенник, полученный от каждого самца, помещали в раствор Буэна для фиксации (17–18 часов при комнатной температуре под вытяжкой), после чего переносили в пробирку с 70% спиртом, где хранили при +4°C для последующего гистологического анализа. Исследуемый материал обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. На санном микротоме изготавливали серийные срезы толщиной 5–10 мкм и монтировали на предметные стекла смесь белка и глицерина в пропорции 1 : 1. Для получения обзорных препаратов срезы окрашивали гематоксилином Бемера и эозином. Препараты исследовали под световым микроскопом при увеличении $\times 200$.

Морфометрическое исследование гистологических препаратов поперечных срезов семенников проводили с использованием программного обеспечения Motic Image Inc. Измеряли общую площадь семенного канальца, площадь просвета семенного канальца, площадь островков клеток Лейдига, площадь сосудов и каверн в канальцах и островках клеток Лейдига. Площадь семенного эпителия рассчитывали как разницу площадей семенного канальца и его просвета, а суммарную площадь островков клеток Лейдига – как разницу суммарной площади островков клеток Лейдига и суммарной площади их сосудов.

Определение уровня тестостерона в сыворотке крови. Кровь центрифугировали 20 минут при 6000 об/мин и 4°C, свежую сыворотку отбирали в 1.5 мл пробирки типа Эппендорф, замораживали и хранили при –20°C до определения в ней тестостерона. Тестостерон в сыворотке крови определяли иммуноферментным методом с использованием набора “Стероид ИФА-тестостерон-01” (Алкор Био, Санкт-Петербург).

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили двухфакторным дисперсионным анализом (главные факторы – генотип и возраст) с использованием пакета программ “STATISTICA 8.0”. Различия между выборочными средними оценивали с использованием теста Duncan в рамках двухфакторного дисперсионного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Морфометрия поперечных срезов семенников. Результаты двухфакторного дисперсионного анализа площади семенного эпителия (главные факторы – генотип и возраст животных) позволили установить достоверное влияние генотипа ($F_{1,66} = 25.32, p < 0.001$), возраста ($F_{2,66} = 3.88, p < 0.05$) и достоверное взаимодействие факторов ($F_{2,66} = 6.57, p < 0.01$). Площадь семенного эпителия у мышей инбредной линии РТ на 70 и 80 день жизни была достоверно меньше, чем у 90-дневных животных ($p < 0.05$, рис. 1). На 70 и 80 день жизни площадь семенного эпителия у мышей линии СВА/Лас была достоверно больше, чем у РТ ($p < 0.05$), а на 90 день жизни межлинейных различий не обнаружено (рис. 1). Таким образом, у самцов линии СВА/Лас возрастные изменения с 70 по 90 день жизни по этому признаку отсутствуют, в то время как у самцов линии РТ наблюдается увеличение площади семенного эпителия в период между 70 и 90 днем постнатального онтогенеза.

Двухфакторный дисперсионный анализ площади просвета семенного канальца обнаружил достоверное влияние возраста ($F_{2,66} = 4.79, p < 0.05$) и достоверное взаимодействие факторов ($F_{2,66} = 4.04, p < 0.05$). Площадь просвета семенного канальца достоверно не отличалась у мышей линии РТ и СВА/Лас с 70 по 90 день постнатального онтогенеза (рис. 2). При этом значение параметра на 70 день у самцов линии РТ было достоверно меньше, чем у 90-дневных ($p < 0.05$), в то время как у самцов линии СВА/Лас возрастных различий не наблюдалось. Таким образом, к 70 дню постпубертатного периода у самцов линии СВА/Лас развитие этого признака завершилось.

В изученный период онтогенеза обнаружено достоверное влияние генотипа ($F_{1,66} = 29.67, p < 0.001$) на величину суммарной площади островков клеток Лейдига и достоверное взаимодей-

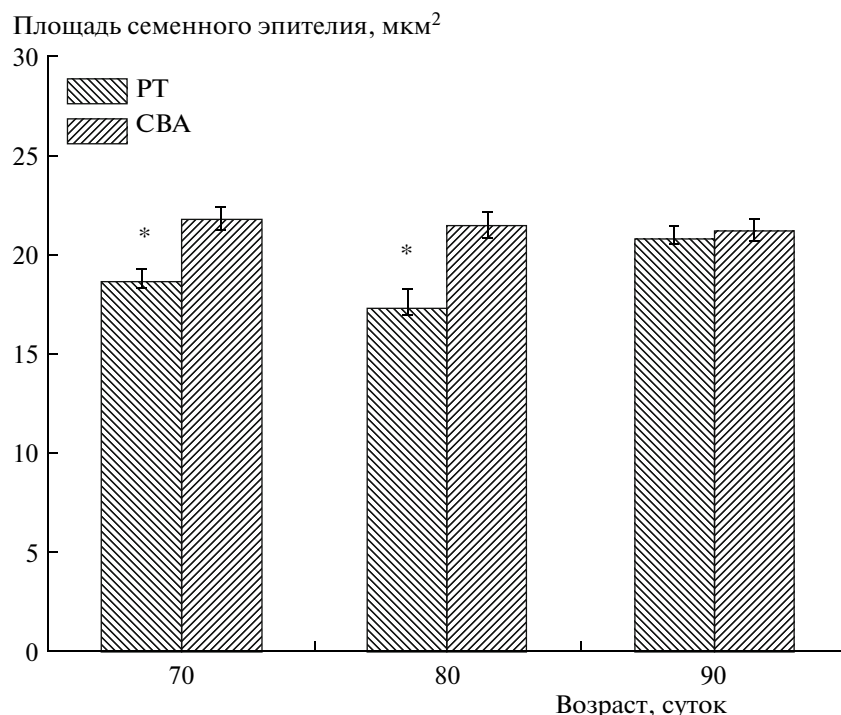


Рис. 1. Площадь семенного эпителия (по оси ординат, мкм²) у самцов мышей инбредных линий PT и CBA/Lac в постпубертатном периоде (по оси абсцисс, сут). Здесь и далее достоверность межлинейных различий у самцов одного возраста: * PT и CBA/Lac.

ствии факторов ($F_{2,66} = 4.60$, $p < 0.05$). Значение этого признака было достоверно выше у самцов линии PT по сравнению с CBA/Lac на 70 и 80 дни жизни ($p < 0.01$, таблица). Достоверных возрастных изменений суммарной площади островков клеток Лейдига у самцов линии CBA/Lac не обнаружено, а у самцов линии PT по этому признаку наблюдались достоверные различия между 70 и 80, а также 80 и 90 днями ($p < 0.01$, таблица).

Масса семенников и масса тела. Двухфакторный дисперсионный анализ массы семенников обнаружил достоверное влияние генотипа ($F_{1,56} = 41.20$, $p < 0.001$), возраста ($F_{2,56} = 4.60$, $p < 0.05$) и взаимодействие факторов ($F_{2,56} = 4.07$, $p < 0.05$). Самцы линии PT на 80 и 90 день жизни имели бо-

лее высокую массу семенников, чем CBA/Lac ($p < 0.01$, рис. 3). Масса семенников у самцов линии PT увеличивалась между 70 и 80, 80 и 90 днями жизни ($p < 0.05$). В то же время достоверных возрастных различий по массе семенников у самцов линии CBA/Lac не наблюдалось.

Обнаружено достоверное влияние возраста ($F_{2,54} = 31.23$, $p < 0.001$), генотипа ($F_{1,54} = 49.24$, $p < 0.001$), а также их взаимодействия ($F_{2,54} = 5.85$, $p < 0.01$) на массу тела. Масса тела достоверно отличалась у самцов обеих линий ($p < 0.05$) на 70 и 90 дни постнатального онтогенеза (рис. 4), внутрилинейные возрастные различия наблюдались у самцов линии PT между 70 и 80 днем ($p < 0.05$), а у

Уровень тестостерона в сыворотке крови (нг/мл) и суммарная площадь островков клеток Лейдига (мкм²) у самцов мышей инбредных линий PT и CBA/Lac в постпубертатном периоде

Показатель	Линия	Возраст, дней		
		70	80	90
Уровень тестостерона	PT	1.09 ± 0.63	3.12 ± 1.33	3.39 ± 1.53
	CBA/Lac	2.85 ± 1.13	3.14 ± 1.32	3.16 ± 0.52
Суммарная площадь островков клеток Лейдига	PT	10.51 ± 0.54*	11.16 ± 1.17*	10.09 ± 0.52
	CBA/Lac	7.66 ± 0.29	7.71 ± 0.49	8.45 ± 0.30

Примечание: * – обозначена достоверность межлинейных различий, $p < 0.05$.

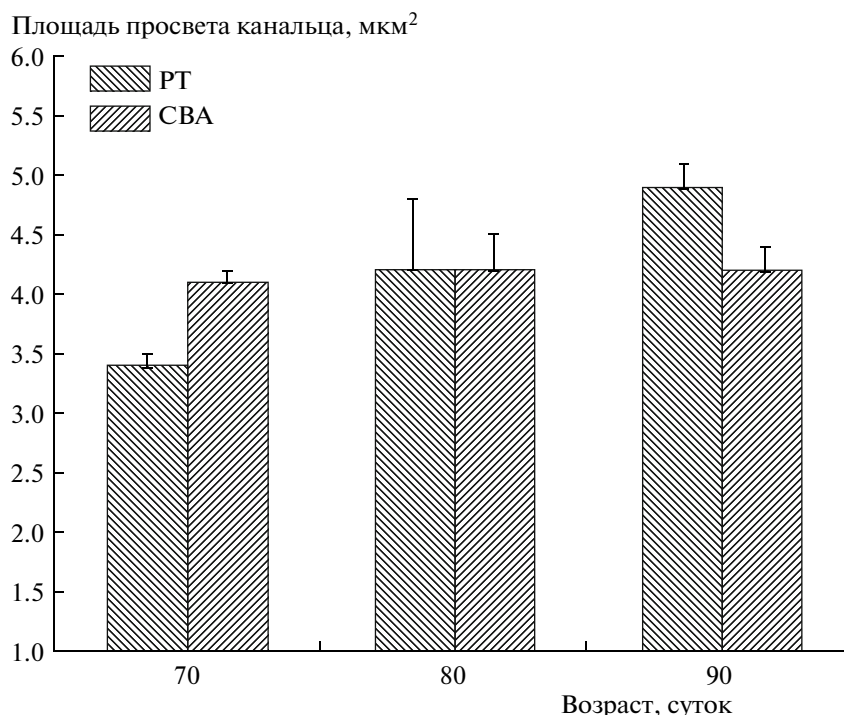


Рис. 2. Площадь просвета семенного канальца (по оси ординат, $\mu\text{м}^2$) у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас в постпубертатном периоде (по оси абсцисс, сут).

самцов линии СВА/Лас между 80 и 90 днями ($p < 0.05$).

Уровень тестостерона и количество эпидидимальных сперматозоидов. Статистический анализ уровня тестостерона в сыворотке крови не позволил установить межлинейные и возрастные изменения (таблица). Количество эпидидимальных сперматозоидов у самцов линии РТ и СВА/Лас достоверно различались на протяжении всего изучаемого периода с 70 по 90 день, при этом достоверных возрастных изменений обнаружено не было (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Известно, что половое созревание означает переходный период между сексуально неполнозрелым состоянием и состоянием полной репродуктивной активности, что выражается в значительном увеличении веса и линейных размеров тела (Terasawa, Fernandez, 2001). По существующим в литературе представлениям, гормональная функция взрослых клеток Лейдига у мышей заканчивает свое формирование к 56–60 дню постнатального онтогенеза, когда популяция “взрослых” клеток Лейдига секретирует тестостерон в значительных количествах (Dong et al., 2007).

Полученные нами результаты показывают, что у самцов линии СВА/Лас морфогистологические параметры семенников, такие как площадь се-

менного эпителия, просвета семенного канальца и островков клеток Лейдига мало меняются в постпубертатный период от 70 до 90 дня жизни, в то время как у самцов линии РТ на протяжении этого периода наблюдалось увеличение всех трех параметров. В тот же период онтогенеза наблюдались межлинейные различия по массе семенников: у самцов линии РТ масса семенников продолжала увеличиваться от 70 до 80 дня жизни, в то время как у СВА/Лас – оставалась на одном уровне.

Известно, что масса и морфофункциональные характеристики семенников взаимосвязаны, и масса семенников может служить маркером полового созревания (Argyropoulos, Shire, 1989; Chubb, 1992; Le Roy et al., 2001). Полученные в настоящей работе данные свидетельствуют о генетических особенностях полового созревания у лабораторных мышей. На основании полученных данных можно предполагать, что морфофункциональное созревание семенников у самцов линии РТ длится значительно дольше, чем у СВА/Лас и выходит за рамки общепринятой временной классификации полового созревания.

Как известно, количество клеток Сертоли и гоноцитов, которые составляют основную массу семенного эпителия, детерминирует продукцию сперматозоидов и в конечном итоге – репродуктивную эффективность самцов (Chubb, 1992; Petersen, Söder, 2006; Leal, Franc, 2009). В нашем исследовании обращает на себя внимание большее

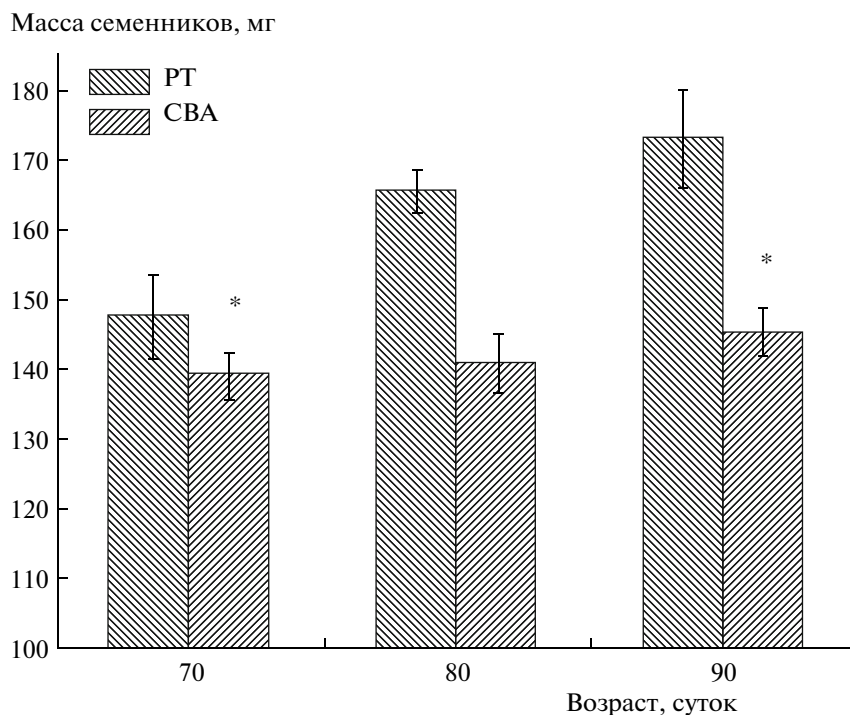


Рис. 3. Масса семенников (по оси ординат, мг) у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас в постпубертатном периоде (по оси абсцисс, сут).

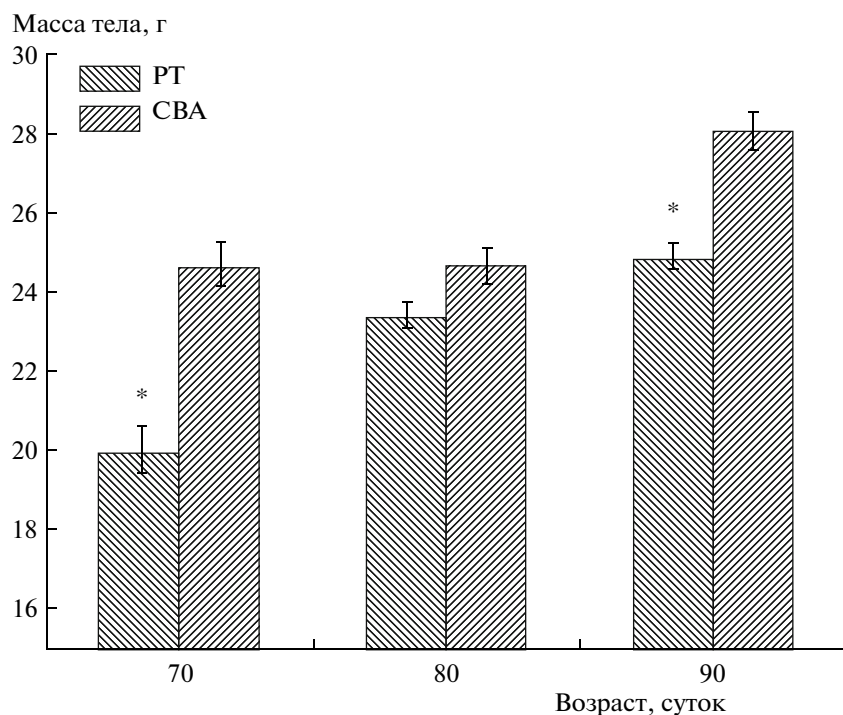


Рис. 4. Масса тела (по оси ординат, г) у самцов мышей инбредных линий РТ и СВА/Лас в постпубертатном периоде (по оси абсцисс, сут).

количество эпидидимальных сперматозоидов у мышей линии РТ по сравнению с СВА/Лас на протяжении всего изучаемого периода. При этом большая площадь семенного эпителия наблюда-

лась у самцов линии СВА/Лас по сравнению с РТ на 70 и 80 дни жизни, указывая на тот факт, что этот показатель не может служить маркером эффективности сперматогенеза. Действительно,

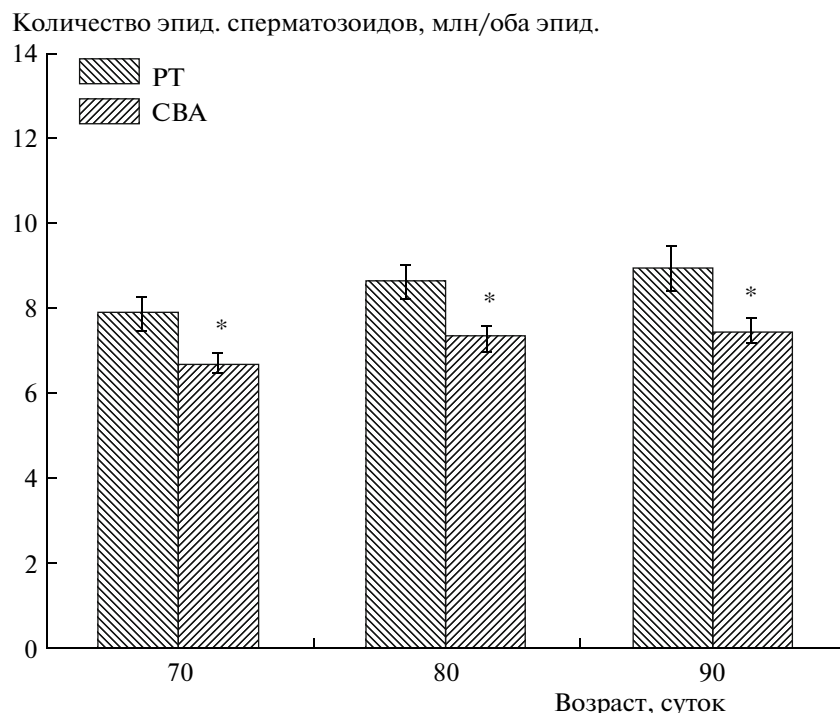


Рис. 5. Количество эпидидимальных сперматозоидов (по оси ординат, млн/оба эпидидимиса) у самцов мышей инбредных линий PT и CBA/Lac в постпубертатном периоде (по оси абсцисс, сут).

продукция сперматозоидов может в значительной степени определяться не толщиной сперматогенного эпителия, а длиной семенных канальцев и объемом (весом) семенников.

Известно, что важные аспекты функционирования клеток Сертоли, такие как митоз, дифференциация, синтез эстрадиола и андроген-связывающего протеина, а также секреция канальцевой жидкости и факторов роста являются зависимыми от продукции тестостерона (Bardin et al., 1994). Чтобы установить связь между тестикулярной продукцией тестостерона и гистоморфологическими показателями, мы исследовали суммарную площадь клеток Лейдига на поперечных срезах семенников. Обнаружены межлинейные различия в площади клеток Лейдига на 70 и 80 день жизни, однако по уровню тестостерона в сыворотке крови межлинейных различий не было найдено. Таким образом, в этот период онтогенеза гистоморфологические показатели клеток Лейдига не коррелируют с уровнем тестостерона в сыворотке крови. С другой стороны, базальный уровень тестостерона может не отражать гормональный потенциал семенников, что подтверждается реакцией семенников на введение ХГ, к которому имеют сродство ЛГ-рецепторы клеток Лейдига (Осадчук, Свешников, 1998; Дубовенко, Осадчук, 2010). Сравнение гормонального потенциала клеток Лейдига показало их более высокую функциональную активность у самцов мышей

линии PT по сравнению с CBA/Lac (Осадчук, Свешников, 1998; Дубовенко, Осадчук, 2010).

Таким образом, в настоящей работе у самцов лабораторных мышей были обнаружены генетические различия в паттерне морфологических и гистоморфометрических параметров тестикулярного развития в постпубертатный период.

Выражаем благодарность за помощь в подготовке гистологических препаратов д.б.н. А.В. Сахарову, к.б.н. А.А. Макееву Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант № 09-04-00930).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Дубовенко Е.А., Осадчук Л.В. Гормональная реакция семенников на хорионический гонадотропин у мышей инбредных линий CBA/Lac и PT: эффект дозы и времени после введения препарата // Бюллетень эксп. биологии и медицины. 2010. Т. 150. № 8. С. 194–198.
- Осадчук Л.В. Межлинейные различия в формировании генеративной функции в период полового созревания у самцов мышей // Онтогенез. 2010. Т. 41. Вып. 3. С. 213–220.
- Осадчук А.В., Свешников К.В. Генетический контроль активности микросомальных ферментов стероидогенеза в клетках Лейдига инбредных линий мышей // Генетика. 1998. Т. 34. № 9. С. 1277–1285.

- Argyropoulos G., Shire J.G.M.* Genotypic effects on gonadal size in fetal mice // *J. Reprod. Fertil.* 1989. V. 86. P. 473–478.
- Bardin C.W., Cheng C.Y., Mustow N.A. et al.* The Sertoli cell // *The Physiology of Reproduction* / Eds. Knobil E., Neil J.D. N.Y.: Raven Press Ltd., 1994. P. 1291–1331.
- Chubb C.* Genes regulating testis size // *Biol. Reprod.* 1992. V. 47. P. 29–36.
- Dong L., Jelinsky S.A., Finger J.N. et al.* Gene expression during development of fetal and adult Leydig cells // *Ann N.Y. Acad. Sci.* 2007. V. 1120. P. 16–35.
- Leal M.C., Franc L.R.* Slow increase of Sertoli cell efficiency and daily sperm production causes delayed establishment of full sexual maturity in the rodent *Chinchilla lanigera* // *Theriogenology.* 2009. V. 71. P. 509–518.
- Le Roy I., Tordjman S., Migliore-Samour D. et al.* Genetic Architecture of Testis and Seminal Vesicle Weights in Mice // *Genetics.* 2001. V. 158. P. 333–340.
- Mendis-Handagama C.S.M.L., Ariyaratne S.H.B.* Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis // *Biology of Reproduction.* 2001. V. 65. P. 660–671.
- Nel-Themaat L., Gonzalez G., Akiyama H., Behringer R.R.* Illuminating testis morphogenesis in the mouse // *J. Androl.* 2010. V. 31. P. 5–10.
- Petersen C., Söder O.* The Sertoli Cell – A Hormonal Target and “Super” Nurse for Germ Cells That Determines Testicular Size // *Horm. Res.* 2006. V. 66. P. 153–161.
- Terasawa E., Fernandez D.L.* Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates // *Endocrinol. Rev.* 2001. V. 22. P. 111–151.

Growth and Development Peculiarities of Testicles in Inbred Mice Lines PT and CBA/Lac

N. V. Gutorova, M. A. Kleshchev, and L. V. Osadchuk

*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences,
pr. Akademika Lavrent'eva 10, Novosibirsk, 630090 Russia
e-mail: losadch@bionet.nsc.ru*

Abstract—The goal of this study is to perform a comparative genetic investigation of testicle development during the postpubescence period (from days 70 to 90 of life) in the inbred mice lines PT and CBA/Lac. Interlinear differences in the body and testicular weight, serum testosterone concentration, number of epididymal spermatozoa, area of testicular epithelium, semeniferous tubule lumen, and insulae of Leydig cells were analyzed. It was found that the morphological and histomorphometric parameters of testicles in males from the PT line compared to the males of the CBA/Lac line did not reach a definitive stage with the end of the postpubescence period and kept on developing until day 90 of life. Therefore, genetic differences remain in the postpubertal testicular development of laboratory mice.

Keywords: ontogenesis, morphometry of semen tubules, Leydig cells, testosterone, spermatozoa, inbred mice lines