

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 612.616.3; 612.616.1

РЕГУЛЯЦИЯ СУТОЧНОГО РИТМА ТЕЧЕНИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА У БЕЛЫХ КРЫС*

Е.В. Слесарева, С.М. Слесарев, В.И. Арав,
О.В. Ляпейкова, А.Е. Гречнев

Ульяновский государственный университет

В работе изучена суточная ритмичность течения ключевых этапов сперматогенеза – пролиферации сперматоцитов, мейоза, спермиации – в условиях режима освещения: 12 ч свет / 12 ч темнота. Циркадианные ритмы выявлялись с помощью программ спектрального анализа и графически-параметрического метода. Показано, что удаление эпифиза приводит к утрате всех циркадианных ритмов и рассогласованию течения этапов сперматогенеза со свето-темновым циклом. Денервация семенников не вызывает исчезновения определяемых ритмов, снижая при этом амплитуду колебаний изучаемых процессов.

Ключевые слова: сперматогенез, циркадианные ритмы, эпифизэктомия, денервация.

Введение. Изучение регуляторных механизмов, управляющих ритмическими процессами в организме, является, несомненно, одной из кардинальных проблем современной хронобиологии и сопряженных с нею медицинских дисциплин. Расшифровка принципов деятельности регуляторных факторов управления биоритмами имеет значение не только для развития теоретических основ хронобиологии, но и для понимания природы хронопатологических явлений, разработки методов их коррекции. Циркадианные ритмы активности выявлены для большинства функциональных систем организма. В мужской половой системе хорошо известны сезонные ритмы репродуктивной активности у моноэстричных животных [4, 13]. О структуре циркадианных ритмов созревания мужских половых клеток и факторах, их регулирующих, сведений практически нет, как отсутствуют и сведения, связанные с патологическими из-

менениями мужской репродуктивной системы при десинхронозах.

Течение сперматогенеза регулируется гонадотропными гормонами гипофиза и тестостероном. Уровень указанных гормонов в крови изменяется не только сезонно, но характеризуется и циркадианным ритмом [5, 6, 7]. Наличие суточной периодичности регуляторных механизмов должно сопровождаться соответствующей периодичностью регулируемого процесса – сперматогенеза.

Цель исследования. Выявить циркадианные ритмы течения сперматогенеза и определить факторы их регуляции.

Материалы и методы. Опыт выполнен на 204 самцах беспородных белых крыс массой 160–200 г. Животные в течение 20 дней адаптировались к 12-часовому режиму освещенности (освещение с 6 до 18 ч). На всем протяжении опыта доступ к пище и воде был свободным. Для изучения хроноструктуры течения сперматогенеза и роли эпифиза в его регуляции по истечении адаптационного периода крысы были разделены на три экспериментальные группы: интактные контрольные

* Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России и ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009–2013 гг.», госконтракт № П1056.

ные ($n=90$), эпифизэктомированные ($n=90$) и животные после денервации семенника ($n=24$). Эпифизэктомия проводилась по оригинальной методике [2]. Все болезненные манипуляции с животными выполняли согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ Минвуза от 13.11.1984 г. № 724). Наркоз осуществлялся путем внутривентрального введения тиопентала натрия в дозе 50 мг/кг. Выживаемость животных после операции эпифизэктомии составила 68 %, после денервации семенника – 100 %. Экспериментальных животных, как и интактных, продолжали содержать в условиях вивария при режиме «освещенность/темнота», равном 12/12 (освещение с 6 до 18 ч). Животных с неудовлетворительным состоянием, выражающимся в нарушении координации движений, уменьшении веса, нарушениях функций кишечника, воспалительных процессах, в эксперименте в дальнейшем не использовали.

Эксперимент проводился в период с февраля по апрель. Выведение животных из эксперимента производили под эфирным наркозом на 40–41-й день после оперативных вмешательств через каждые три часа в течение двух суток, что обеспечивало исследование течения сперматогенеза на протяжении двух периодов циркадианного ритма.

Семенники фиксировали в забуференном формалине и по стандартной гистологической методике изготавливали парафиновые поперечные срезы толщиной 5 мкм. После депарафинирования срезы окрашивали ШИК-реакцией с доокрашиванием ядер гематоксилином. Статистическую обработку результатов проводили с использованием метода Фишера-Стьюдента. Уровень значимости был принят $p < 0,05$.

Выявление биоритмов этапов сперматогенеза осуществлялось методом спектрального анализа [3], который позволяет получить распределение квадрата амплитуды колебаний по частотам (рис. 1). Анализ циркадианного ритма проводился с использованием графически-параметрического метода [1] (рис. 2).

Результаты и обсуждение. Циркадианные ритмы сперматогенеза мы определяли, опираясь на изучение суточной динамики ключевых этапов формирования мужских половых клеток, начиная от деления сперматогоний промежуточного типа и включая этап спермиации. На каждом из определяемых этапов (деление сперматогоний промежуточного типа, деление сперматогоний типа Б, мейоз, спермиация) был выявлен циркадианный ритм активности (табл. 1), однако активные фазы и акрофазы выявленных ритмов имели различные положения относительно 24-часовой шкалы.

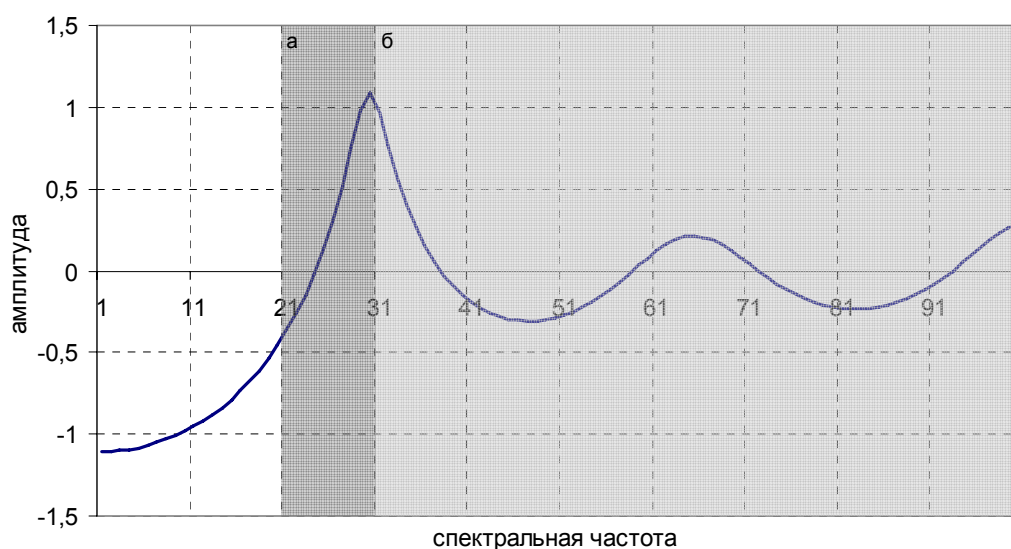


Рис. 1. Результаты спектрального анализа динамики митотического индекса (МИ) сперматогоний промежуточного типа интактных животных: а) область низких частот (зона циркадианного ритма), б) область высоких частот (зона ультрадианного ритма)

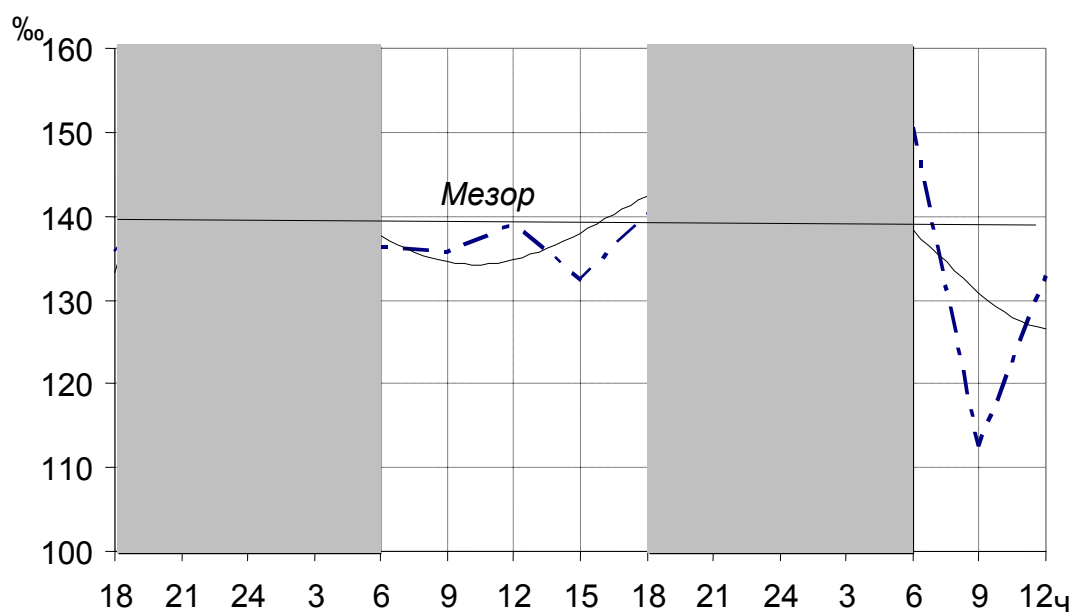


Рис. 2. Суточная динамика митотической активности сперматогоний промежуточного типа intactных белых крыс (серым цветом обозначено темное время суток, белым – светлое время суток)

Таблица 1

Параметры циркадианных ритмов этапов сперматогенеза у intactных животных

Этап сперматогенеза	Период ритма, ч	Амплитуда, %	Активная фаза, ч		Акрофаза, ч/сут	
			I сут	II сут	I сут	II сут
МИ сперматогоний промежут. типа	21,5	38,12	20–5	18–7	3	6
МИ сперматогоний типа Б	24; 8	43,75	5–12	7–12	9	9
Мейоз сперматоцитов	24	33,3	18–4 ³⁰	17 ³⁰ –4	24	24
Спермиация	23	50,62	6–16	4 ³⁰ –12	12	12

Первое из изучаемых событий – пролиферация сперматогоний промежуточного типа – имело акрофазу в темное время суток, равную 3 ч (6 ч во вторые сутки эксперимента), для следующей за ней пролиферацией сперматогоний типа Б пик активности приходился на ранние утренние часы каждого суток эксперимента (9 ч), т.е. данные события на протяжении извитого семенного канальца проходят последовательно.

Регуляция пролиферации сперматогоний у взрослых животных осуществляется в основном фолликулостимулирующим гормо-

ном (ФСГ) гипофиза, который действует как фактор жизнеспособности делящихся сперматогоний и митоген [11], а также имеет циркадианный ритм секреции [6, 9]. Максимальная концентрация ФСГ в плазме крови наблюдается в темное время суток. Таким образом, циркадианная ритмичность выделения регуляторного фактора устанавливает и зависимый от него ритм пролиферации дифференцирующихся сперматогоний. О наличии суточной ритмичности пролиферативных процессов в сперматогониях свидетельствуют и результаты, полученные U.B. Hacher-Klom

[10], который показал наличие циркадианного ритма синтеза ДНК в сперматогониях и препротенных сперматоцитах мышей.

Более поздние этапы развития мужских половых клеток – мейоз и спермиация – у интактных животных также характеризовались циркадианной ритмичностью течения. Акрофаза мейотического деления наблюдалась в 24 ч каждых суток (середина темного времени эксперимента), что также коррелирует с максимальным уровнем содержания основного регуляторного фактора мейотического деления – тестостерона в плазме крови [8, 15]. Наличие циркадианной ритмичности начальных этапов сперматогенеза (пролиферация сперматогоний, мейоз) позволяет сохранить суточную ритмичность и последующим этапам, в частности этапу отделения от клеток Сертоли и выходу в просвет канальца зрелых сперматозоидов – спермиации. Акрофазы этапа спермиации приходились на 12 ч (светлое время) каждых суток эксперимента, когда отмечается наименьший уровень содержания тестостерона в крови крыс [8, 15] (табл. 1). Процесс формирования сперматозоидов из сперматид занимает достаточно большое количество времени, в частности у белых крыс чуть более 13 сут. На протяжении этого вре-

мени основные регуляторные факторы созревания сперматозоидов вырабатываются клетками Сертоли, на которые воздействуют, помимо ФСГ и тестостерона, биоактивные вещества эпифиза [16].

В результате удаления эпифиза у самцов белых крыс наблюдалось достоверное повышение среднесуточных значений митотической активности как сперматогоний промежуточного типа, так и сперматогоний типа Б, что соответствует сложившимся представлениям об ингибиторном влиянии эпифиза на пролиферативные процессы. Наряду с исчезновением ритма пролиферативной активности сперматогоний после эпифизэктомии отмечено нарушение циркадианного ритма последующих этапов сперматогенеза – мейоза и спермиации (табл. 2). Частота встречаемости данных этапов в среднем не отличалась от показателей, полученных у интактных животных. Этот факт также подтверждает отсутствие интенсификации процесса сперматогенеза, несмотря на рост пролиферативной активности сперматогоний. То есть эпифизэктомия приводит к утрате всех суточных ритмов, выявленных в сперматогенной ткани семенника, практически не влияя при этом на количество производимых сперматозоидов.

Таблица 2

Динамика активности этапов сперматогенеза у эпифизэктомированных животных

Этап сперматогенеза	Период ритма, ч	Амплитуда, %	Активная фаза, ч		Акрофаза, ч/сут	
			I сут	II сут	I сут	II сут
МИ сперматогоний промежут. типа	8,9	44	22–1; 7–9 ³⁰ ; 13 ³⁰ –16 ³⁰	22–12	15	12
МИ сперматогоний типа Б	17	59,25	18–23; 4–14	24–9	18; 12	6
Мейоз сперматоцитов	-	31,63	9–15	19–2; 7–12	12	21; 9
Спермиация	10	53	21; 4–10; 13–17	19–12	21; 15	21; 3; 9

В денервированных семенниках в канальцах без визуальных нарушений сперматогенеза определялось снижение уровня митотического индекса сперматогоний изученных типов, однако суточная ритмичность со-

хранялась с преобладанием МИ, как и у интактных животных, в темную фазу фотопериода. Последующие этапы сперматогенеза – мейоз и спермиация – также сохраняли циркадианный ритм активности. Исследования-

ми В.С. Zhu и соавт. [12], S.H. Chow и соавт. [14] показано, что денервация одного семенника в течение месяца не изменяет уровня ЛГ и ФСГ в крови. Таким образом, имеющихся суточных колебаний гуморальных факторов в этом случае оказывается достаточно для сохранения циркадианного ритма митотической активности сперматогоний и последующих этапов сперматогенеза, несмотря на снижающуюся амплитуду ритма.

Заключение. Таким образом, циркадианная ритмичность процесса сперматогенеза складывается из взаимозависимых последовательно текущих этапов размножения, созревания и формирования половых клеток, каждый из которых обнаруживает циркадианный ритм активности. Данная ритмичность обеспечивается суточным ритмом секреции гонадотропных гормонов гипофиза, тестостерона и регуляторных факторов клеток Сертоли, в формировании которых принимает участие эпифиз. Отсутствие длительное время в кровотоке биологически активных веществ эпифиза приводит к утрате циркадианного ритма течения всех этапов сперматогенеза и вызывает рассогласование течения данных процессов со свето-темновым циклом. В то же время нервная система не оказывает прямого регуляторного действия на ритмичность течения сперматогенеза. Денервация семенника приводит лишь к снижению амплитуды выявленных ритмов течения сперматогенеза, не вызывая рассогласования течения данного процесса со свето-темновым циклом.

1. Анализ временных параметров деления клеток при изменении фотопериодичности / Ю. А. Романов [и др.] // Способы регенерации и клеточное деление. М.: Наука, 1979. С. 44–56.

2. Арав В. И., Слесарев С. М., Слесарева Е. В. Метод экстирпации эпифиза у белых крыс // Бюл. экспер. биол. 2008. № 9. С. 385–387.

3. Чугасзян Г. Б. Ритмометрический подход к выявлению скрытой периодичности и описанию формы колебаний // Проблемы хронобиологии, хронопатологии, хронофармакологии и хрономедицины. Уфа, 1985. С. 51–52.

4. Шевлюк Н. Н., Руди В. Н., Стадников А. А. Биология размножения наземных грызунов из семейства беличьих (морфологические, физиологические и экологические аспекты). Екатеринбург: УрО РАН. 1999. 145 с.

5. A glucocorticoid sensitive biphasic rhythm of testosterone secretion / E. Waite [et al.] // J. Neuroendocrinol. 2009. Vol. 21, № 9. P. 737–741.

6. Age-dependent effect of Freund's adjuvant on 24-hour rhythms in plasma prolactin, growth hormone, thyrotropin, insulin, follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone and testosterone in rats / M. Garcia-Bonacho [et al.] // Life Sci. 2000. Vol. 66 (20). P. 1969–1977.

7. Bribiescas R. G., Hill K. R. Circadian variation in salivary testosterone across age classes in Ache Amerindian males of Paraguay // Am. J. Hum. Biol. 2010. Vol. 22, № 2. P. 216–20.

8. Changes in testicular function following specific deprivation of LH in the adult male rabbit / M. Jeyakumar [et al.] // J. Endocrinol. 1995. Vol. 147, № 1. P. 111–120.

9. Effect of interferon-gamma treatment on 24-hour variations in plasma ACTH, growth hormone, prolactin, luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone of male rats / P. Cano [et al.] // Neuroimmunomodulation. 2005. Vol. 12, № 3. P. 146–151.

10. Hacher-Klom U. B. Diurnal changes in murine spermatogenesis // Z. Naturforsch. C. 1994. Vol. 49, № 7–8. P. 522–525.

11. Meachem S., von Schonfeldt V., Slatt S. Spermatogonia: stem cells with a great perspective // Reprod. 2001. Vol. 121, № 6. P. 825–834. 9

12. Neural control of the compensatory increase of testosterone in hemicastrated adult male rats / B. C. Zhu [et al.] // Acta physiologica Sinica. 2000. Vol. 52, № 1. P. 10–16.

13. Seasonality of reproduction in mammals: intimate regulatory mechanisms and practical implications / P. Chemineau [et al.] // Reprod. Domest. Anim. 2008. Vol. 43, № 2. P. 40–47.

14. The effects of testicular denervation on spermatogenesis in the Sprague-Dawley rat / S. H. Chow [et al.] // Neuroendocrinology. 2000. Vol. 72, № 1. P. 37–45.

15. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH / R. I. McLachlan [et al.] // J. Endocrinol. 1996. Vol. 148. P. 1–9.

16. Ultrastructural and morphometric study of the Sertoli cell of the viscacha (*Lagostomus maximus maximus*) during the annual reproductive cycle / E. M. Muñoz [et al.] // Anat. Rec. 2001. Vol. 262, № 2. P. 176–185.

THE REGULATION OF CIRCADIAN RHYTHM OF SPERMATOGENESIS FLOW IN WHITE RATS

E.V. Slesareva, S.M. Slesarev, V.I. Arav,
O.V. Lyapeykova, A.E. Grechnev

Ulyanovsk State University

In this paper we studied the circadian rhythm of the flow of spermatogenesis key stages – the proliferation of spermatogonia, meiosis, sperm separation – under the regime of illumination: 12 hours light and 12 hours dark. Circadian rhythms were detected with spectral analysis programs, and graphically the parametric method. It is shown that the removal of the pineal gland leads to a loss of circadian rhythms and mismatch in flow of the spermatogenesis stages with the dark-light cycle. The testis denervation does not cause the disappearance of defined rhythms, while reducing studied processes vibration amplitude.

Keywords: spermatogenesis, circadian rhythms, pinealectomy, denervation.