

АЦАЕВА М.М., КОЛОМИЕЦ О.Л.

*Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН
Россия, 119991, г. Москва, ул. Губкина, 3, e-mail: olkolomiets@mail.ru*

ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ НАРУШЕНИЙ В СТРУКТУРЕ СИНАПТОНЕМНЫХ КОМПЛЕКСОВ, ВЫЗВАННЫХ КСЕНОБИОТИКАМИ В СПЕРМАТОЦИТАХ МЫШИ

На стадии профазы I мейоза происходят важнейшие события, определяющие дальнейшую прогрессию сперматогенеза вплоть до формирования зрелых, способных к оплодотворению, сперматозоидов. Формирование структурных нарушений хромосом в мейозе может иметь драматические последствия, приводить к серьезным нарушениям постмейотических процессов, тератоспермии, азооспермии и, в конечном итоге, к стерильности самцов млекопитающих или патологии потомства. Наиболее информативным методом анализа хромосомных нарушений в профазе I мейоза является анализ тотальных препаратов синаптонемных комплексов (СК). Синаптонемный комплекс (СК) является своеобразным скелетом мейотического бивалента, поэтому конфигурация осевых элементов, приобретающих роль боковых элементов в структуре СК, служит парадигмой поведения гомологов на стадии профазы I мейоза [9]. На основе метода анализа СК, предложенного Counce & Meyer (1973), удается проследить все детали формирования осевых элементов, начало их физического сближения и синапсиса на стадии зиготены, синапсис и его коррекцию у гетерозигот по хромосомным перестройкам на ста-

дии пахитены, и динамику десинапсиса хромосом на стадии диплотены. Успехи, достигнутые цитогенетикой на основе анализа СК, свидетельствуют о перспективности использования этого метода для решения актуальных проблем генетической безопасности [1, 3, 5, 6].

Целью настоящего исследования служил сравнительный анализ действия 1,1-диметил гидразина (1,1-ДМГ) – компонента ракетного топлива, и противоопухолевого цитостатика циклофосфана (ЦФ) на структуру СК самцов мыши и процесс сперматогенеза в целом.

Актуальность исследования обусловлена тем, что загрязнению 1,1-ДМГ, обладающим сильным токсическим и мутагенным действием (Глушко, 1985), подверглись значительные территории России, однако действие 1,1-ДМГ на хромосомы сперматоцитов I порядка млекопитающих до сих пор не было исследовано. Вместе с тем, ранее установлено, что 1,1-ДМГ вызывает серьезные нарушения сперматогенеза у растущих крыс [4]. Параллельно было проведено сравнительное исследование СК у самцов мыши после введения циклофосфана (ЦФ) – противоопухолевого препарата, высоко генотоксичного для незрелых половых клеток.

Материалы и методы

Исследованы СК 14 самцов мыши после воздействия МПД 1,1-ДМГ (70 мг/кг); 8 самцов после внутрибрюшинного введения ЦФ в течение десяти дней по 250 мг/кг в сутки. 8 контрольным самцам ежедневно вводили воду для инъекций. Животных забивали с помощью дислокации шейных позвонков. Семенники извлекали, семенные каналцы гомогенизировали. Приготовление препаратов распластанных ядер сперматоцитов I порядка (спредов) и их фиксацию проводили по методу Navarro (1981). Для идентификации осевых элементов хромосом и латеральных элементов СК использовали кроли-

чьи антитела к белку SCP3 – мажорному белку латеральных элементов СК; центромеры идентифицировали с помощью антител к центромерным белкам (ACA). Участки транскрипционного сайленсинга хроматина выявляли с помощью антител к гистону γ H2AX. Кроме того, анализировали под световым микроскопом и фотографировали суспензию клеток семенника и суспензию эпидидимальных сперматозоидов. Препараты анализировали с помощью универсального флуоресцентного микроскопа Axioimager D1 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты и обсуждение

1. Нарушения в структуре сперматозоидов у животных, получавших 1,1-ДМГ и у контрольных (интактных животных). У контроль-

ных животных доля патологических сперматозоидов составляла в среднем 28,4 %; у самцов, получавших МПД 1,1-ДМГ–83,5 %. Были выяв-

лены следующие нарушения в структуре сперматозоидов: отсутствие периаксонемных структур в основном отделе жгутика; аномальное закручивание среднего отдела жгутика сперматозоида; отсутствие митохондриальной спирали в среднем отделе жгутика сперматозоида; сперматозоиды с аморфной структурой головки. Ранее Муравлева с соавт. (2007) на 30 сутки после однократного введения отъемышам крыс 1,1-ДМГ в гораздо меньшей дозе (5 мг/кг) выявили тенденцию к снижению числа подвижных и малоподвижных сперматозоидов и увеличение на 32 % (по сравнению с контролем) количества мертвых сперматозоидов. На 90 сутки у самцов этой группы развивалась астенозооспермия, тератозооспермия и резко (в 4 раза), возросло число сперматозоидов с патологией хвоста и патологией головки (в 5 раз) по сравнению с контролем.

2. Анализ СК мейотических хромосом. Контроль. В большинстве сперматоцитов I порядка контрольных животных СК имели обычную структуру с равномерным распределением белка SCP3 по структуре СК (рис.1). Половой (XY) бивалент на стадии поздней пахитены формировал половое тельце, выселенное на периферию ядра. В ядрах контрольных животных встречались отдельные нарушения структуры СК, в частности, нарушение формирования полового тельца, но они не имели тотальный характер, количество ядер с нарушениями составляло в среднем 19,7 %.

3. Анализ СК самцов, получавших 1,1-ДМГ. Тяжелые поражения структуры СК были отмечены у всех самцов, получавших 1,1-ДМГ. У самцов №6, 14 и 18 не обнаружено ни одной клетки с нормальным СК. У этих животных наблюдалась тотальная фрагментация СК на стадиях лептотены-пахитены. Это крайне тяжелое поражение хромосом формирующихся половых клеток, которое производит впечатление необратимой мейотической катастрофы. В некоторых ядрах не удавалось идентифицировать сформированные СК. Вторым распространенный тип нарушений – формирование атипичных утолщений СК и формирование конгломератов SCP3. В таких ядрах белок γ H2AX связывался с некоторыми аутосомами и не связывался с половым бивалентом, что, как известно, приводит к аресту клеток на стадии пахитены – пахитен-

ному аресту [11]. У животных, получавших 1,1-ДМГ, также обнаружено формирование кольцевых хромосом, чему должны предшествовать делеции хромосом.

Анализ СК самцов, после внутрибрюшинного введения ЦФ. У животных этой группы на 1 сутки после окончания десятидневного введения ЦФ в 100 % ядер наблюдалась фрагментация СК и распад ядер на фрагменты. На 60 сутки после введения ЦФ обнаружена резкая гипотрофия семенников. Получить потомство от таких самцов не удалось.

Как видно из изложенных результатов, нами установлено, что введение 1,1-ДМГ и ЦФ самцам мыши вызывает тяжелейшие нарушения сперматогенеза.

У четырех животных после введения 1,1-ДМГ и у всех самцов после введения ЦФ не было обнаружено ни одной клетки с полностью сформированными СК. В некоторых ядрах блок мейоза наступал еще на стадии прелептотены – не формировались даже полноценные осевые элементы хромосом. Фрагментация ядер наблюдалась и на стадии пахитены. Такие клетки дегенерировали. Иными словами, выявлены морфологические признаки, так называемой, «мейотической катастрофы», блокирующей сперматогенез на стадии мейоза. Нарушение синапсиса хромосом приводило к нарушению формирования полового тельца и пахитенному аресту [8, 11]. Судя по полученным нами результатам, нарушения касались сперматоцитов на всех стадиях профазы I мейоза и сперматогониев. Последнее может приводить к стойкому необратимому нарушению сперматогенеза и стерильности животных. Высокая токсичность 1,1-ДМГ и ЦФ может вызывать стойкое изменение метаболизма клеток семенника, что влечет за собой энергетические нарушения в клетках сперматогенного ряда, что также может приводить к апоптозу развивающихся половых клеток.

У большинства животных после введения 1,1-ДМГ сперматозоиды все-таки формировались, однако, большинство из них имели признаки дегенерации или нарушения движения, в частности, сперматозоиды без митохондрий. У трех самцов не обнаружено ни одного сперматозоида с нормальной структурой. У двух самцов было выявлено уменьшение массы и уплотнение ткани семенников.

Выводы

Выявленные нарушения в структуре СК свидетельствует о высокой генотоксичности использованных в работе ксенобиотиков для кле-

ток сперматогенного ряда. Такие нарушения приводят к нарушению фертильности самцов и несут риск передачи хромосомных нарушений

потомству. Количественные различия в степени поражения клеток семенника у разных самцов могут быть обусловлены не только их различной устойчивостью к действию 1,1-ДМГ, но и раз-

личием в поведении животных, так как доминирующие самцы могли получать больше пищи и, соответственно, получали большую дозу 1,1-ДМГ.

Литература

1. Богданов Ю.Ф., Коломиец О.Л. Синаптонемный комплекс – индикатор динамики мейоза и изменчивости хромосом // Товарищество научных изданий КМК. – М. – 2007 – 358 с.
2. Глушко В.П. Космонавтика // Советская энциклопедия. – М. – 1985. – 398 с.
3. Коломиец О.Л., Абудуев Н.К., Мазурова Т.Ф., Брагина Е.Е., Дадашев С.Я., Курило Л.Ф., Богданов Ю.Ф. Повреждающее действие антибиотиков на структуру синаптонемных комплексов мейотических хромосом мыши // Генетика. – 2001. – Т. 37, № 2. – С. 197–206.
4. Муравлева Л.Е., Култанов Б.Ж., Медведев В.И., Танкибаева Н.У., Мустафина Ф.Х., Бритыко В.В., Дюйсекеева Б.Н., Ключев Д.А. Влияние несимметричного диметилгидразина на сперматогенез растущих животных // Успехи современного естествознания. – 2007. – Т. 12. – С. 525–527.
5. Сухачева Т.В., Коломиец О.Л., Лосева Е.Ф. Анализ структуры и поведения синаптонемных комплексов после однократного введения камптотецина – ингибитора ДНК-топоизомеразы I // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1998. – Т. 25, №1. – С. 84–88.
6. Allen J.W., Gibson J.B., Poorman P.A., Backer L.C., Moses M.J. Synaptonemal Complex Damage Induced by Clustogenic and Anti-Mitotic Chemicals: Implications for Nondisjunctions and Aneuploidy. *Mutat. Res.* – 1988. – Vol. 201. – P. 313–324.
7. Counce S.J., Meyer G.F. Differentiation of the synaptonemal complex and the kinetochore in *Locusta* spermatocytes studied by whole mount electron microscopy // *Chromosoma.* – 1973. – Vol. 44. – P. 231–253.
8. Homolka D., Ivanek R., Capkova J., Jansa P., Forejt J. Chromosomal rearrangement interferes with meiotic X chromosome inactivation // *Genome Res.* – 2007. – Vol. 17, №10. – P. 1431–1437.
9. Moses M.J. Microspreading and synaptonemal complex in cytogenetic study // *Chromosomes Today.* – 1977. – Vol 6. – P. 71–82.
10. Navarro J., Vidal R., Quitart M., Egozcue J. A method for the sequential study of synaptonemal complex by light and electron microscopy // *Hum. Genet.* – 1981. – Vol. 59, №4. – P. 419–421.
11. Turner J.M.A., Mahadevaiah S.K., Ellis P.J.I., Mitchell M.J., Burgoyne P.S. Pachytene asynapsis drives meiotic sex chromosome inactivation and leads to substantial postmeiotic repression in spermatids // *Developmental Cell.* – 2006. – Vol. 10, №4. – P. 521–529.

ATSAEVA M.M., KOLOMIETS O.L.

N.I. Vavilov Institute of General Genetics, RAS

Russia, 119991, Moscow, Gubkin str., 3, e-mail: olkolomiets@mail.ru

IMMUNOFLUORESCENT ANALYSIS OF THE STRUCTURE OF SYNAPTONEMAL COMPLEX DAMAGE INDUCED BY XENOBIOTICS IN MICE SPERMATOCYTES

Aims. The aim of this study was a comparative analysis of the effects of 1,1-dimethyl hydrazine (1,1-DMH) – a component of rocket fuel, and anti-cancer drug cyclophosphan (CP) to the structure of the synaptonemal complex (SC) of male mice and selection of the defective spermatocytes I at meiosis. **Methods.** Immunofluorescent analysis of the structure of SC damage and chromatin silencing. **Results.** Multiple damage in the structure of the SCs or even the absence of SC has been detected at the spermatocytes nuclei after the introduction of 1,1-DMH and CP to male mice. The most common damage were fragmentation of SCs, the disturbance of the chromosome synapsis and architectonics of the nuclei. Ring chromosome and SCP3 protein aggregates were also found. There were every indication of pachytene arrest at many nuclei. We revealed morphological features, the so-called meiotic catastrophe that blocked meiosis at the different stages of meiosis. **Conclusions.** 1,1-DMH and CP cause dramatic damage of meiotic chromosomes, which carries a risk of disruption of spermatogenesis, infertility and risk of chromosomal aberrations of offspring, as evidenced by the detection of abnormal sperm.

Key words: synaptonemal complex, spermatocytes, mice, 1,1-dimethyl hydrazine, immunofluorescent analysis.