

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт экологии растений и животных
Уральского отделения Российской академии наук

На правах рукописи



Смирнов Георгий Юрьевич

ВЛИЯНИЕ ВЫБРОСОВ МЕДЕПЛАВИЛЬНЫХ ЗАВОДОВ
НА КАЧЕСТВО ЭПИДИДИМАЛЬНЫХ СПЕРМАТОЗОИДОВ
МОДЕЛЬНЫХ ВИДОВ ГРЫЗУНОВ

1.5.15. Экология (биологические науки)

1.5.12. Зоология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
кандидат биологических наук,
старший научный сотрудник
Ю. А. Давыдова

Екатеринбург – 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Введение.....	4
Глава 1. Изучение влияния химического загрязнения на сперматозоиды млекопитающих.....	13
1.1 Сперматозоиды как объект экологической токсикологии	13
1.2 Современные методы анализа сперматозоидов.....	20
1.2.1 CASA – автоматический анализ сперматозоидов	25
Глава 2. Материал и методы	29
2.1 Районы исследования	29
2.1.1 Район СУМЗ	31
2.1.2 Район КМК.....	34
2.2 Характеристика модельных видов грызунов	36
2.3 Отлов, содержание и обследование грызунов	39
2.4 Численность и структура популяций модельных видов.....	42
2.5 Морфофизиологические характеристики самцов.....	47
2.6 Анализ морфологических показателей сперматозоидов	50
2.6.1 Анализ встречаемости аномальных сперматозоидов.....	50
2.6.2 Анализ морфометрических показателей сперматозоидов.....	51
2.6.3 Объем и структура выборок.....	52
2.7 Анализ подвижности и концентрации сперматозоидов	55
2.8 Измерение концентраций металлов в организме.....	59
2.9 Статистический анализ.....	62
2.9.1 Анализ естественной изменчивости морфологических показателей сперматозоидов.....	62
2.9.2 Анализ влияния химического загрязнения на морфологические показатели сперматозоидов	63
2.9.3 Анализ подвижности и концентрации сперматозоидов	64
2.9.4 Оценка влияния индивидуальной токсической нагрузки на сперматозоиды.....	64
2.9.5 Оценка влияния химического загрязнения на комплекс показателей сперматозоидов.....	65

Глава 3. Морфологические показатели сперматозоидов	66
3.1 Естественная изменчивость	66
3.1.1 Меж- и внутривидовая изменчивость морфометрических показателей сперматозоидов.....	66
3.1.2 Онтогенетическая изменчивость морфологических показателей сперматозоидов	75
3.2 Влияние химического загрязнения	81
3.2.1 Морфометрические показатели сперматозоидов	81
3.2.2 Встречаемость аномальных сперматозоидов.....	81
Глава 4. Подвижность сперматозоидов	90
4.1 Референтные значения показателей подвижности сперматозоидов	90
4.2 Межвидовые различия показателей подвижности сперматозоидов	95
4.2.1 Сравнение близкородственных видов полевок	95
4.2.2 Сравнение полевок и малой лесной мыши	96
4.3 Выбор ключевых показателей подвижности сперматозоидов.....	100
4.4 Подвижность сперматозоидов в разных популяционных группах.....	101
4.5 Влияние химического загрязнения	102
Глава 5. Концентрация сперматозоидов	105
5.1 Референтные значения концентрации сперматозоидов.....	105
5.2 Межвидовые различия показателей концентрации сперматозоидов	109
5.3 Концентрация сперматозоидов в разных популяционных группах	110
5.4 Влияние химического загрязнения	111
Глава 6. Влияние индивидуальной токсической нагрузки на сперматозоиды	113
6.1 Факторы накопления тяжелых металлов грызунами	113
6.2 Связь показателей сперматозоидов с индивидуальной токсической нагрузкой.....	121
Глава 7. Связи между морфологией, подвижностью и концентрацией сперматозоидов.....	125
Заключение	132
Выводы	136
Список литературы	137

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Устойчивость популяций млекопитающих к токсической нагрузке во многом определяется эффективностью воспроизводства, поэтому его различные параметры, в том числе показатели репродуктивной системы, всегда привлекали внимание экотоксикологов [Llobet et al., 1995; Мухачева, 2001, 2016; Damek-Poprawa, Sawicka-Karusta, 2003, 2004; Ieradi et al., 2003; Безель, 2006; Ивантер, Медведев, 2007; Давыдова и др., 2009; Miska-Schramm et al., 2014, 2017; Amuno et al., 2016]. Одним из крупнейших источников токсикантов являются крупные промышленные предприятия, особенно заводы с первичной плавкой цветных металлов.

При изучении вклада самцов в воспроизводство популяции рассматривают все звенья мужской репродукции – от морфологии тканей и органов до физиологических и поведенческих реакций. К наиболее важным аспектам изучения воспроизводства относят качество эякулированных и эпидидимальных сперматозоидов, что тождественно оценке потенциальной фертильности. Традиционно тестирование качества сперматозоидов базируется на прямых методах диагностики фертильности – морфологии, подвижности и концентрации, которые в комплексе характеризуют их оплодотворяющую способность. В свою очередь, каждый из этих аспектов может включать несколько показателей: например, подвижность сперматозоидов мышевидных грызунов характеризуют восемью различными величинами [Yeste et al., 2018].

На практике одновременно все три блока показателей обычно исследуют только у человека или хозяйственно значимых видов. У животных из природных популяций исследование всего комплекса затруднено, так как необходимы особые условия для их отлова и содержания, отбора эякулята, его анализа и т.д. Тем не менее, с той или иной полнотой сперматозоиды исследовали у «диких» сумчатых [Hughes, 1965], парнокопытных [Malo et al., 2006; Gizejewski et al., 2008], хищных [Wolf et al., 2000] и крупных грызунов (*Castor fiber*) [Bierla et al., 2007].

При исследовании мелких млекопитающих (в частности, мышевидных грызунов) отмеченные выше трудности, особенно в отношении отбора сперматозоидов и их анализа, усугубляются небольшими размерами животных и их половых органов, а также небольшим объемом проб. Таким образом, даже для «универсальной модели» – лабораторных мелких грызунов – получение обычной спермограммы не считают рутинной процедурой. Несмотря на то, что еще с 1960-х гг. начались эксперименты с электростимуляцией эякуляции у лабораторных мышей [Birnbaum, Hall, 1961; Mauss et al., 1970; Anderson et al., 1983; Hernandez et al., 2004], этот метод не стал распространенным из-за сложности применяемой аппаратуры и дискуссионности результатов.

В настоящее время подавляющее большинство исследований на мелких грызунах выполняют с использованием эпидидимальных сперматозоидов, поскольку после успешных опытов на разных видах млекопитающих по оплодотворению самок сперматозоидами из хвоста придатка семенника *in vivo* и *in vitro*, их свойства считают эквивалентными эякулированным [Lakoski et al., 1988; Cooper, 2007; Monteiro et al., 2011]. Эти выводы послужили основанием для криоконсервации эпидидимальных сперматозоидов редких и исчезающих животных в генбанках, что, в конечном счете, важно для сохранения биоразнообразия [Amstislavsky et al., 2012; Амстиславский и др., 2016]. На этих выводах также основан выбор эпидидимальных сперматозоидов для настоящего исследования.

Со спецификой нашего объекта исследований – мышевидных грызунов из природных популяций – связана не только полнота анализа сперматозоидов, но и предпочтительность одних показателей по сравнению с другими, которые используют разные группы исследователей. У практикующих репродуктологов первое место среди показателей мужской фертильности занимают показатели подвижности сперматозоидов, которую считают ключевым фактором, влияющим на доставку отцовского генетического материала к яйцеклетке [Buffone et al., 2012; Алоян и др., 2013]. В противоположность медицинской репродуктологии, у диких грызунов чаще исследуют морфологические признаки сперматозоидов.

Качественную оценку морфологии сперматозоидов – наличие и спектр патологических изменений (аномалий или дефектов) – используют для изучения генетической изменчивости [Styrna et al., 2003; Осадчук, Осадчук, 2010], для оценки влияния различных факторов среды [Мамина, 2012; Kruczek et al., 2013; Kotula-Balak et al., 2014; Мальцев и др., 2016], в том числе загрязнения [Ribeiro et al., 1987; Tannenbaum et al., 2003; Rafique et al., 2009].

Экотоксикологические аспекты функционирования репродуктивной системы самцов мышевидных грызунов изучены фрагментарно, а устойчивость различных ее параметров к действию экотоксикантов (в том числе тяжелых металлов) до сих пор дискуссионна. Большинство исследователей считают половые клетки самцов чувствительными к загрязнению [Miska-Schramm et al., 2014, 2017], однако до сих пор данные о качестве сперматозоидов грызунов с загрязненных территорий неполны и часто противоречивы: авторы не всегда обнаруживают токсические эффекты, например, уменьшение подвижности и концентрации сперматозоидов, или увеличение доли аномальных клеток [Llobet et al., 1995; Tannenbaum et al., 2003, 2007].

Крайне немногочисленны работы, в которых одновременно исследовали и репродуктивные параметры (как правило, только структуру семенника), и концентрации тяжелых металлов в организме [Jeradi et al., 2003; Damek-Poprawa, Sawicka-Kapusta, 2004]. К «белым пятнам» можно отнести практически полное отсутствие сведений о связи между индивидуальной токсической нагрузкой и качеством сперматозоидов.

Таким образом, актуальность исследования определяется тремя аспектами:

- 1) важностью воспроизводства для устойчивости популяций животных;
- 2) дефицитом данных по показателям морфологии, подвижности и концентрации сперматозоидов у широко распространенных видов грызунов;
- 3) дискуссионностью вопроса об устойчивости параметров мужской репродуктивной системы грызунов из природных популяций к химическому загрязнению.

Объекты исследования

Поскольку задачи работы связаны с анализом влияния химического загрязнения на широкий спектр показателей сперматозоидов грызунов из природных популяций, выбрали три вида грызунов, широко распространенных на Среднем Урале. Два вида относятся к семейству Cricetidae: рыжая полевка (*Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780) и красная полевка (*Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779); один вид – к семейству Muridae: малая лесная мышь (*Sylvaemus uralensis* Pallas, 1811).

Виды различаются по типу питания (полевки преимущественно зеленояды, малая лесная мышь – семенояд), биотопической приуроченности (малая лесная мышь охотнее селится в антропогенных местообитаниях), подвижности (малая лесная мышь более подвижна и может перемещаться на расстояние до 9 км [Григоркина, Оленев, 2018] и ряду других свойств. Кроме того, рыжая и красная полевки – близкородственные виды, образующие гибриды в эксперименте [Осипова, Соктин, 2006, 2008] и в природе [Абрамсон и др., 2009; Бородин и др., 2011]. Включение в анализ рассматриваемых видов позволяет оценить адаптивную способность репродуктивной системы животных к условиям загрязнения у таксономических групп с существенно различающимися свойствами.

Влияние химического загрязнения на показатели сперматозоидов исследовали с учетом варианта развития грызунов [Оленев, 2002]. Предпосылкой для этого послужили представления о том, что различия многих характеристик (в том числе репродуктивных) между сеголетками и перезимовавшими особями детерминированы вариантами онтогенеза [Оленев, 1989, 2002, 2009].

Цель исследования – оценка влияния выбросов медеплавильных заводов на качество эпидидимальных сперматозоидов модельных видов грызунов из природных популяций (*Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780; *Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779; *Sylvaemus uralensis* Pallas, 1811).

Задачи исследования:

1) определить морфологические показатели, подвижность и концентрацию сперматозоидов грызунов, населяющих участки с контрастными (фоновыми и импактными) уровнями химического загрязнения от выбросов медеплавильных заводов;

2) оценить межвидовую и внутривидовую (онтогенетическую) изменчивость показателей сперматозоидов;

3) оценить концентрации приоритетных загрязнителей – тяжелых металлов (Cu, Zn, Cd, Pb) – в организме грызунов и охарактеризовать связь качества сперматозоидов с индивидуальной токсической нагрузкой.

В ходе работы проверяли *гипотезы*: 1) химическое загрязнение ухудшает показатели сперматозоидов грызунов из природных популяций; 2) реакция сперматозоидов на химическое загрязнение видоспецифична; 3) реакция сперматозоидов на химическое загрязнение зависит от варианта онтогенеза.

Положения, выносимые на защиту:

1. Выбросы медеплавильных заводов слабо влияют на сперматозоиды *Clethrionomys glareolus*, *Cl. rutilus* и *Sylvaemus uralensis* из природных популяций. Наиболее чувствительны к токсической нагрузке показатели подвижности сперматозоидов. На импактных участках у *Cl. glareolus* показатели морфологии (доля аномальных клеток) и подвижности изменяются однонаправленно – в сторону ухудшения качества сперматозоидов, что свидетельствует о согласованной реакции половых клеток на загрязнение.

2. Реакция (степень выраженности и направленность изменений) показателей сперматозоидов на выбросы медеплавильных заводов видоспецифична: полевки сильнее реагируют на загрязнение по сравнению с малой лесной мышью.

3. Показатели морфологии, подвижности и концентрации эпидидимальных сперматозоидов *Cl. glareolus*, *Cl. rutilus* и *S. uralensis* не зависят от варианта

онтогенеза, потенциальный вклад сеголеток и перезимовавших особей в воспроизводство популяции можно считать равноценным.

Научная новизна

Впервые влияние выбросов медеплавильных заводов (зоны загрязнения и индивидуальной токсической нагрузки) на качество эпидидимальных сперматозоидов грызунов из природных популяций оценено для комплекса показателей – морфологических (размеры клеток, доля аномальных клеток с дефектами головки и хвоста), подвижности (доля подвижных клеток, скорость и прямолинейность движения) и концентрации сперматозоидов.

Впервые количественно оценен вклад межвидовой и онтогенетической изменчивости в вариабельность показателей эпидидимальных сперматозоидов грызунов из окрестностей медеплавильных заводов.

Теоретическая и практическая значимость

Новые сведения о показателях сперматозоидов грызунов из природных популяций существенно дополняют имеющийся пул знаний об особенностях размножения в условиях химического загрязнения. Выводы о влиянии химического загрязнения на потенциальную фертильность грызунов из природных популяций важны для понимания механизмов устойчивости репродуктивных показателей самцов и прогнозирования судьбы популяций в условиях сильных токсических нагрузок.

Выводы об отсутствии влияния варианта онтогенеза на большинство изученных показателей позволяют исключить из анализа этот источник изменчивости и сконцентрировать внимание на анализе изменчивости, связанной со стадиями полового развития (созреванием, зрелостью, угасанием половой функции). Информация об изменчивости эпидидимальных сперматозоидов позволяет оптимизировать протоколы анализа и исключать малоинформативные показатели. Апробированные для разных видов грызунов протоколы комплексного обследования сперматозоидов могут стать основой для разработки

универсальной схемы с возможностью ее использования широким кругом специалистов в области экотоксикологии, популяционной экологии и зоологии.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов определяется значительном объемом фактического материала: проанализировано 570 особей модельных видов грызунов, отловленных в ходе 5 полевых сезонов (отработано 5099 ловушко-суток), в анализ включено 307 мазковых препаратов эпидидимальных сперматозоидов, 141 определение показателей подвижности и концентрации сперматозоидов на автоматическом анализаторе спермы, выполнено более 1000 элементо-определений тяжелых металлов. Все лабораторные работы выполнены на современном аттестованном оборудовании. Достоверность результатов также обусловлена применением современных методов статистического анализа.

Результаты исследований были представлены на 11 конференциях: ежегодные Всероссийские конференции молодых ученых «Экология: факты, гипотезы, модели» (Екатеринбург, 2017, 2018, 2019, 2021, 2022 гг.); Первая Всероссийская научная конференция «Токсикология и радиобиология XXI века» (Санкт-Петербург, 2017); Международная научно-практическая конференция, посвященная 90-летию Заслуженного эколога России Н.И. Литвинова «Итоги и перспективы развития териологических исследований азиатской России и сопредельных территорий» (Иркутск, 2017); XV Всероссийская Молодежная научная конференция «Физиология человека и животных: от эксперимента к клинической практике» в рамках III Всероссийской молодежной научной конференции (с элементами научной школы) «Молодежь и наука на Севере» (Сыктывкар, 2018); XV Конгресс Международной ассоциации морфологов (Ханты-Мансийск, 2020), Межрегиональная конференция «Научные исследования на ООПТ Урала», посвященная 50-летию Висимского государственного природного биосферного заповедника (Екатеринбург, 2021); XI Съезд Териологического общества при РАН «Млекопитающие в меняющемся мире: актуальные проблемы териологии» (Москва, 2022).

Исследование выполнено в рамках тем НИР лаборатории экотоксикологии популяций и сообществ ИЭРиЖ УрО РАН (2015–2017 гг., № 0400-2015-0025, 2017–2019 гг., № АААА-А18-118031690077-1, 2019–2021 гг., № 0400-2014-0026). В 2019–2021 гг. работа была поддержана РФФИ (проект № 19-34-90004 «Аспиранты»).

Личный вклад автора

Автор участвовал в разработке общего плана исследования и ряда протоколов анализов, в частности протоколов по отбору образцов эпидидимальных сперматозоидов, классификации аномальных клеток, композиции питательной среды для анализа подвижности сперматозоидов. Подавляющий объем полевой и камеральной работы был организован и выполнен лично автором или при его непосредственном участии, включая отлов животных, отбор и анализ биологических образцов, определение абсолютного возраста животных, измерение морфометрических показателей сперматозоидов, измерение их концентрации и подвижности, пробоподготовку образцов для химического анализа. Анализ данных и обобщение результатов выполнены автором при консультациях с научным руководителем.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 5 статей в журналах из Перечня ВАК, в том числе 4 публикации в изданиях, индексируемых в WoS и Scopus.

Благодарности

Автор выражает благодарность своему научному руководителю – к.б.н. Ю.А. Давыдовой за стойческое терпение и помощь на всех этапах работы, д.б.н. Е.Л. Воробейчику – за обсуждение результатов работы, к.б.н. И.А. Кшнясеvu и к.б.н. А.Н. Созонтову – за консультации по статистической обработке данных, ведущему инженеру Э.Х. Ахуновой – за определение концентраций тяжелых металлов.

Автор также благодарит за ценные замечания д.б.н. В.С. Безеля, д.б.н. Е.А. Бельского, д.б.н. Л.Е. Лукьянову, к.б.н. В.П. Мамину, к.б.н. С.В. Мухачеву, д.б.н. Г.В. Оленева, к.б.н. М.А. Фоминых.

Автор чрезвычайно признателен к.б.н. С.В. Мухачевой, к.б.н. А.Н. Созонтову, Т.Н. Орехову, а также администрации и сотрудникам Висимского государственного биосферного заповедника за помощь в сборе материала.

Глава 1. ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ХИМИЧЕСКОГО ЗАГРЯЗНЕНИЯ НА СПЕРМАТОЗОИДЫ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

1.1 Сперматозоиды как объект экологической токсикологии

Реакцию животных на химическое загрязнение изучает экологическая токсикология – сравнительно молодая наука, сформировавшаяся в конце 60-х – начале 70-х гг. XX в. Ее возникновение во многом было обусловлено стремительно нарастающим влиянием деятельности человека на экосистемы: появлением новых видов вооружений, развитием промышленности и сельского хозяйства (удобрения, пестициды) [Безель, 2006]. Появились многочисленные задокументированные факты поражения и загрязнения экосистем металлургическими предприятиями: в Садбери (Канада), Палмертоне (США), Гузуме (Швеция) и Эйвонмауте (Великобритания), Рур (Германия), Минамата (Япония). Публикации 1970–1980-х гг. об этих источниках загрязнения легли в основу современных представлений о влиянии химического загрязнения и стали основой для экотоксикологии [Воробейчик, 2022].

Новое направление науки очень быстро формировалось. Если изначально экотоксикологию рассматривали как ответвление медицинской токсикологии, изучающей токсические эффекты, не связанные непосредственно с человеком, то благодаря становлению в этот же период экологии, ее возрастающей популярности и распространению широкого «экологического взгляда» буквально на все, включая и проблемы загрязнения, экотоксикология стала самостоятельным направлением в экологии.

Современная экотоксикология базируется на фундаментальных достижениях обеих наук – экологии и медицинской токсикологии. При этом экология очерчивает сферу интереса (цель, предмет и новые принципы нормирования) – преимущественно биологические системы надорганизменного уровня в их непосредственном взаимодействии с окружающей (загрязненной) средой, а медицинская токсикология предлагает широкий спектр методов

изучения токсических эффектов на отдельные организмы [Безель, 2006]. Так, большинство методов оценки фертильности животных из природных популяций базируется на методах, разработанных классической токсикологией, в первую очередь, лабораторных экспериментах с затравкой. К экологическим методам относят натурные наблюдения, популяционный анализ, математическое моделирование и др. [Безель, 2006].

Экотоксикология, в отличие от медицинской токсикологии, характеризуется «отложенной антропоцентричностью» и следует идее сохранения и защиты (в том числе от химического воздействия) природной среды для будущих поколений. Основные усилия при этом направлены на изучение сложно структурированных систем популяционного и ценотического уровней. Неоднократно подчеркивалось, что при изучении надорганизменных систем возрастает значение окружающей среды как активного фактора, влияющего и на поведение экотоксикантов, и на проявление токсических эффектов [Безель и др., 1994, 2001].

По аналогии с популярной сегодня «доказательной медициной» можно говорить и о феномене «доказательной экотоксикологии». Наука облигатно использует данные о концентрациях токсикантов (в том числе тяжелых металлов) в биосубстратах и организмах, чтобы уловить и оценить связь между уровнем загрязнения (или индивидуальной токсической нагрузкой) и биологическими (морфологическими, физиологическими и др.) характеристиками организмов. Однако экотоксикология отнюдь не сводится к изучению концентраций токсических веществ в биосубстратах и организмах, поскольку важнее «оценка значимости этих показателей для судьбы популяции или биоценоза» [Безель, 2006].

Опыт, накопленный в настоящее время экотоксикологией, огромен. Подобно медицине, исследующей болезнь от острого течения до хронического, экотоксикология исследует экосистемы от начальных этапов воздействия загрязнителей до этапов, характеризующихся снижением при реконструкции предприятий или полным прекращением выбросов при их закрытии. Это позволяет оценивать долговременные тренды, а также реконструировать

деятельность человека и его влияние на биоту в более ранние периоды. Так, например, из-за низкой подвижности металлов в почвах высокие уровни остаточного загрязнения обнаруживают вблизи давно прекративших свою деятельность предприятий, вплоть до древних плавильных Средневековья и времен Римской империи [Воробейчик, 2022]. Причем такое историческое загрязнение способно негативно влиять на биоту и в наше время: показано, что тяжелые металлы (свинец и кадмий) из древнего почвенного пула попадают в организм мелких млекопитающих [Samizuli et al., 2018].

Все пространство, занятое человеком, подвержено химическому загрязнению, поэтому экотоксикологическими исследованиями охвачена, без преувеличения, вся планета. Реакцию на химическое загрязнение изучают во всем разнообразии объектов биоты – от почв (состав, структура, обменные процессы) и населяющих их педобионтов до птиц и млекопитающих [Давыдова, Мухачева, 2014; Трубина и др., 2014; Сморгалов, 2016; Мухачева, 2017; Belskii, Mikryukov, 2018; Mikryukov et al., 2020; Михайлова, 2020; Vorobeichik et al., 2021].

Токсические эффекты изучают на разных уровнях организации живой материи. Если эффекты популяционного и экосистемного уровня – снижение биоразнообразия и численности, обеднение структуры популяций, упрощение видового состава сообществ, деформация естественных потоков вещества и энергии – наглядны и интерпретируемы, то эффекты на суборганизменном уровне часто не очевидны. Из-за наличия различных тканевых барьеров и эндогенных гомеостатических механизмов суборганизменные показатели в меньшей степени подвержены влиянию изменяющихся условий окружающей среды [Безель, 2006].

Однако изучение токсических эффектов на суборганизменном уровне позволяет выявить механизмы интегрирующих демографических процессов. Сказанное относится и к изучению влияния загрязнения на репродуктивные характеристики животных.

Мелкие млекопитающие, населяющие промышленные районы, в процессе жизни подвергаются как непосредственному воздействию загрязненной токсикантами среды (в первую очередь через объекты питания – растения,

беспозвоночных и воду), так и косвенному – через пессимизацию местообитаний [Wijnhoven et al., 2007; Lukáň, 2009; Miska-Schramm et al., 2014; Мухачева, 2021]. Считают, что приспособление к токсическим факторам среды реализуется на основе компенсаторных демографических реакций в популяциях, таких как снижение численности популяций и/или обеднение состава сообществ [Безель, 2006; Мухачева, 2021].

Ключевая роль в адаптации, направленной на выживание вида в неблагоприятных условиях, принадлежит воспроизводству. Например, увеличение плодовитости самок рассматривают в качестве одного из механизмов адаптации, направленной на выживание вида (компенсацию гибели) в неблагоприятных условиях [Пястолова и др., 1989; Лукьянов, Лукьянова, 1990; Тестов, 1993; Рождественская, 1999; Кудяшева и др., 2004]. Однако, несмотря на обилие фактического материала, общие закономерности варьирования плодовитости животных, связанные с качеством среды обитания, до сих пор не выявлены [Безель, 2006].

Объяснение этому есть. Так, изучение морфологических и функциональных показателей сперматозоидов необходимо для оценки потенциальной фертильности самцов, но не достаточно для определения их оплодотворяющего потенциала [Muller, 2000; Amann, Hammerstedt, 2002]. Невозможно точно определить оптимальное качество сперматозоидов для наступления беременности, числа плодов или уровня выживаемости потомства, поскольку после образования зиготы начинает действовать комплекс факторов, связанных не только с качеством сперматозоидов.

Проблему пытаются преодолеть, сопоставляя оценки потенциальной и фактической плодовитости самок и фертильности самцов с численностью популяции [Мухачева, 2001, 2021; Михеева и др., 2006; Давыдова, 2007; Мамина, Малкова, 2021; и др.] .

В системе популяционных параметров самки «отвечают» за большую часть репродуктивных показателей, таких как число размножающихся особей, скорость полового созревания, продолжительность репродуктивного периода, количество

приносимых самкой в течение репродуктивного периода пометов, длительность межродовых промежутков, потенциальная и реализованная плодовитость (желтые тела беременности, эмбрионы, плацентарные пятна). «Вклад» самцов в общую картину воспроизводства популяции чаще всего выражается в единственном однозначном показателе – числе размножающихся особей.

Однако, поскольку репродуктивные способности самцов не зависят от влияния ресурсозатратного вынашивания потомства, созревшие самцы в популяции всегда максимально реализованы в отношении фертильности (в отличие от самок с их циклами беременности/вынашивания самцы всегда готовы к спариванию), насколько это возможно в конкретных условиях среды. Это обстоятельство позволяет изучать различные показатели фертильности на суборганизменном уровне и оценивать «чистые» эффекты влияния внешней среды, в том числе загрязнения.

Экотоксикологические аспекты функционирования репродуктивной системы самцов грызунов изучены фрагментарно, а устойчивость различных ее параметров к действию экотоксикантов до сих пор дискуссионна. Часть авторов считают, что семенники очень чувствительны к химическому загрязнению [Parizek, 1983; Nolan, Shaikh, 1986; Sugawara et al., 1989; Chubb, 1992]. Исследуя структуру семенников в условиях лабораторного эксперимента, некоторые авторы обнаружили патоморфологические изменения, которые были интерпретированы ими как токсические эффекты [Corpas et al., 2002; Toman et al., 2002; Дуденкова, Шубина, 2013; Макутина, 2013; Боков и др., 2014]. В то же время у грызунов из природных популяций отмечали устойчивость микроморфологических признаков семенников к химическому воздействию [Damek-Poprawa, Sawicka-Kapusta, 2004; Мухачева, Давыдова, 2006; Давыдова, 2007].

S. Wadi и G. Ahmad (1999) исследовали влияние свинца на состояние репродуктивной системы лабораторных мышей (CF-1) в экспериментах с затравкой: полученные дозы не влияли на массу семенника и уровень тестостерона, но уменьшали массу семенных пузырьков и эпидидимиса, концентрацию и подвижность сперматозоидов, повышали процент их

патологических форм. L.A. Ieradi с соавт. (2003) изучали генотоксические эффекты у желтогорлой мыши (*Apodemus flavicollis*) и рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) под влиянием выбросов нефтехимической промышленности и тепловых электростанций. Для этого они определяли концентрации тяжелых металлов в печени и почках животных, проводили микроядерный тест и подсчет аномальных сперматозоидов. Оказалось, что полевки по сравнению с мышами накапливают меньше поллютантов, а количество аномальных клеток у особей фоновых и импактных участков не различается. На основании этого авторы сделали вывод о том, что желтогорлые мыши более предпочтительны для биоиндикационных целей.

Н.К. Гагарская и Е.Н. Чернова (2010) исследовали влияние выбросов свинцово-плавильного завода в Приморском крае на восточноазиатскую мышь (*Apodemus peninsulae*) и полевую мышь (*Apodemus agrarius*). В годы высоких выбросов предприятия (до 1996 г.) у животных отмечали увеличение частоты патологий головки сперматозоидов в 3–8 раз по сравнению с фоновыми значениями, у некоторых особей фиксировали прекращение сперматогенеза. В 2007 г., после длительного периода сниженных выбросов, повторные исследования обнаружили у обоих видов увеличение численности и усложнение популяционной структуры, а у самцов – нормальный сперматогенез и снижение частоты аномалий головки сперматозоидов [Гагарская, Чернова, 2010].

В серии экотоксикологических работ А. Miska-Schramm с соавт. (2014, 2017), выполненных на рыжей полевке, рассмотрен широкий спектр показателей сперматозоидов, а также проанализирована морфология семенников. При этом работы представляют собой эксперименты с затравками сульфатом меди (2014 г.) и хлоридом алюминия (2017 г.) грызунов из лабораторной колонии (Institute of Environmental Sciences, Jagiellonian University, Poland). Авторы показали «классические» дозовые эффекты: с увеличением дозы у полевок наблюдали уменьшение подвижности и концентрации сперматозоидов, а также отмечали морфологические нарушения клеток. В другом исследовании влияния алюминия на репродуктивную функцию у самцов домашней мыши (*Mus musculus*) при

затравке обнаруживали уменьшение концентрации сперматозоидов, однако подвижность и количество аномальных клеток не изменялось [Llobet et al., 1995].

Особое место в списке экотоксикологических работ занимают, на наш взгляд, работы L.V. Tannenbaum с соавт., разработавших RSA (Rodent Sperm Analysis) – метод оценки загрязненности территорий от деятельности промышленных предприятий и рудников, утилизации боеприпасов и т.д., основанный на анализе фертильности самцов грызунов из природных популяций [Tannenbaum et al., 2003, 2007, 2009; Tannenbaum, Lee, 2011; Tannenbaum, Beasley, 2016; Tannenbaum, 2020]. Метод включает изучение показателей эпидидимальных сперматозоидов – морфологии, подвижности и концентрации. Согласно этому методу, территория может быть признана загрязненной, если показатели подвижности и концентрации сперматозоидов снижены до «пороговых» уровней, например, показатели подвижности должны быть снижены на 40–50 %, концентрации – на 80–90 %. Столь высокие пороговые значения авторы объясняют тем, что самцом вырабатывается «в 10–20 раз больше сперматозоидов, чем необходимо для оплодотворения» [Tannenbaum et al., 2007; Tannenbaum, Beasley, 2016]. В то же время, по мнению авторов, для морфологических показателей преодоление порога достигается при увеличении доли аномальных сперматозоидов лишь до 4 %. Однако, несмотря на обнаруживаемые статистические различия между показателями сперматозоидов грызунов с фоновых и загрязненных территорий, значения морфологических и функциональных показателей почти никогда не преодолевают пороговые уровни. L.V. Tannenbaum с соавт. (2007, 2016) объясняют это относительной «чистотой» исследуемых территорий и делают вывод о том, что они не нуждаются в специальных очистных, рекультивационных и других мероприятиях.

Подробно результаты указанных выше работ будут обсуждены в соответствующих главах диссертации.

Таким образом, исследования сперматозоидов животных из природных популяций малочисленны и в подавляющем большинстве представляют собой лабораторные эксперименты с затравкой; сведения о состоянии сперматозоидов у

диких грызунов отрывочны, величину измерения параметров сложно интерпретировать (поскольку нет референтных значений); редко исследуют весь комплекс параметров сперматозоидов, чаще всего – только морфологию половых клеток.

1.2 Современные методы анализа сперматозоидов

Появление новых методов анализа сперматозоидов (спермы) животных связано с развитием сперматологии (от греч. σπέρμα, ατος τό – семя, начало, источник и λόγος – слово, понятие, учение) – научного направления в биологии, изучающего морфологию и физиологию анизогамных мужских гамет (активные – сперматозоиды (англ. sperm cells, spermatozoa) и пассивные – спермии (англ. spermatia)), а также процессы их образования, транзита и оплодотворения яйцеклетки. Это направление тесно связано со многими другими разделами биологии и медицины – цитологией, эмбриологией, андрологией, урологией, криобиологией, медицинской (репродуктивной) токсикологией.

Как наука, сперматология стала формироваться только в XX в. – ее началом считают появление работ Густава Ретциуса [Retzius, 1909]. В целом ей пришлось пройти долгий путь – от понимания того, что такое сперматозоиды и какова их роль в эмбриогенезе, до появления новых методов (например, мечения клеток, электронной микроскопии) и направлений (например, изучения молекулярно-генетических аспектов функционирования клеток).

Ярким примером включения сперматологии в теорию эволюции и экологию можно считать работы Джеффа Паркера 1970-х гг. с описанием новой концепции «конкуренции сперматозоидов» (sperm competition) [Parker, 1970; Parker, Smith, 1975; Voorman, Parker, 1976]. Дж. Паркер показал, что существует посткоитальная конкуренция за оплодотворение между самцами. Конкуренция, в свою очередь, приводит к давлению отбора и быстрой эволюции мужской половой системы: от гениталий разной формы до размера и количества сперматозоидов. В это же время известный сперматолог Э. Рузен-Ранге, занимавшийся изучением сперматогенеза у разных животных, написал: «... теперь становится ясным, что единственно

возможным и фактически допустимым является более широкий, более динамический и «экологический» взгляд на сперматозоиды» [Рузен-Ранге, 1980]. Именно этих эволюционных и экологических взглядов на сперматозоиды животных мы придерживались при написании нашей работы.

Необходимо также сделать пояснение об используемой нами терминологии. В разных областях биологии и медицины понятия «сперма», «сперматозоид», «спермий» определяют по-разному. Чтобы избежать терминологических разночтений, мы во всех случаях, кроме прямого цитирования некоторых авторов, использовали термин «сперматозоид», определяя его как активную анизогамную мужскую микрогамету.

Для оценки качества сперматозоидов млекопитающих чаще исследуют эякулят (сперму) – опалесцирующую, светло-серую мутную жидкость, выделяемую при эякуляции (семяизвержении) самцами животных, и состоящую из сперматозоидов и семенной жидкости (секрета добавочных половых желез) [Осипов, 2017].

У мелких животных отбор эякулята затруднен из-за размера органов и некоторых физиологических особенностей (у грызунов – из-за образования быстро затвердевающей «пробки», секрета коагулирующих желез, препятствующего обратному току спермы из половых путей самки после полового акта), поэтому разработаны различные методы получения эякулированных сперматозоидов [Carballada, Esponda, 1992; Adebayo et al., 2015; Voersma et al., 2015; Li et al., 2015].

К ним относят:

- 1) электроэякуляцию с помощью ректального зонда и электростимулятора;
- 2) фармакоэякуляцию, которая происходит в результате индуцирования эякуляции специальными препаратами, стимулирующими сокращение гладкой мускулатуры организма. Примерами могут служить окситоциновая стимуляция или применение парасимпатомиметиков (пилокарпин, физостигмин).

- 3) вымывание сперматозоидов из матки самок, спарившейся с целевым самцом.

Однако все методы получения эякулята оказались слишком трудоемкими и плохо воспроизводимыми и поэтому не получили широкого распространения [Snyder, 1966; Bennet, Vickery, 1970; Tecirlioglu et al., 2002; Yamauchi, Ward, 2007; Li et al., 2015].

Существенные сложности отбора эякулята у мелких млекопитающих обусловили развитие другой группы методов, связанной с получением сперматозоидов из разных отделов мужской половой системы – семенника, придатка семенника (головки, тела и хвоста), семявыносящего протока. Наиболее часто исследуют эпидидимальные сперматозоиды из хвостового отдела придатка семенника (эпидидимиса), поскольку они характеризуются лучшей оплодотворяющей способностью по сравнению с клетками из других отделов мужской половой системы. Кроме того, отбор клеток из семявыносящего протока не рекомендуется из-за непостоянства его наполнения (эякуляции) [Seed et al., 1996; Tayama et al., 2006; Cooper, 2007].

Отобрать эпидидимальную жидкость со сперматозоидами из хвостовой части придатка можно следующими способами:

1) методом MESA (microsurgical epididymal sperm aspiration) или PESA (percutaneous epididymal sperm aspiration). Это единственные нетерминальные способы взятия сперматозоидов из эпидидимиса с помощью шприца, но их невозможно использовать для измерения концентрации из-за плохой воспроизводимости [Voersma et al., 2015];

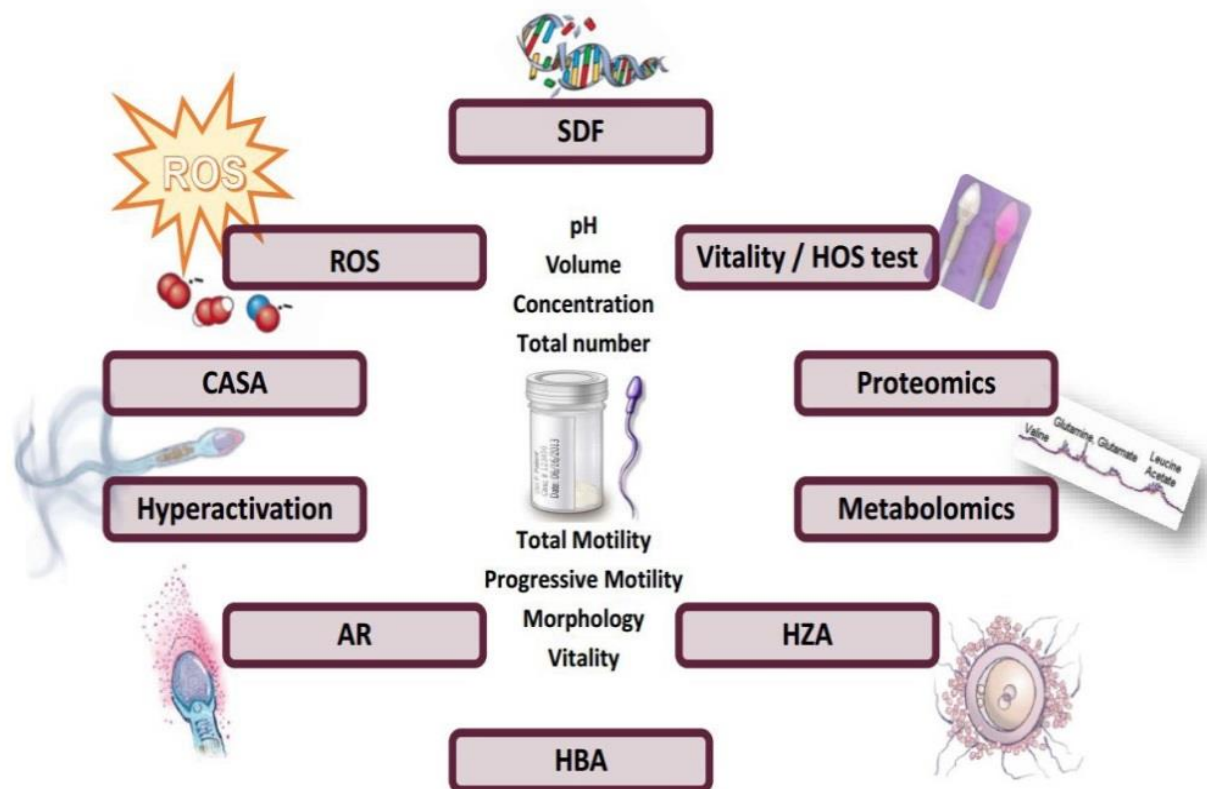
2) проколом или разрезом извлеченного эпидидимиса, помещенного в питательную среду, после чего сперматозоиды перемещаются (всплывают) в нее. При этом способе отбора число подвижных клеток может быть завышенным [Gómez Montoto et al., 2011a; Tourmente et al., 2015];

3) гомогенизацией – измельчением эпидидимиса в питательной среде для подсчета общего количества сперматозоидов (эпидидимального запаса). Метод используется для измерения концентрации, однако не позволяет одновременно оценивать подвижность клеток [Tannenbaum et al., 2007; Осадчук, Клещёв, 2016];

4) проколом придатка с моментальным отбором эпидидимальной жидкости и помещением в питательную среду [Смирнов, 2022]. Данный способ позволяет оценить и концентрацию клеток в эпидидимальной жидкости и провести измерения подвижности клеток.

Подробно о достоинствах и недостатках использования этих методов изложено в разделах диссертации 2.6 – 2.8.

В настоящее время разнообразие методов анализа эякулированных и эпидидимальных сперматозоидов человека и животных очень высоко. Кроме классических методов определения цвета, объема, водородного показателя (pH) эякулята, а также анализа морфологии, жизнеспособности, подвижности и концентрации сперматозоидов, появился целый ряд новых методов (Рисунок 1.1).



SDF – sperm DNA fragmentation, HOS test – hypo-osmotic swelling test, HZA – hemizona assay, HBA – hyaluronan binding assay, AR – acrosome reaction, CASA – computer-aided sperm analysis, ROS – reactive oxygen species

Рисунок 1.1 – Современные виды анализа сперматозоидов, цит. по [Van der Horst, du Plessis, 2017]

Можно выделить следующие основные методы современной сперматологии:

- SDF (sperm DNA fragmentation) – комплекс методов Comet, FISH, TUNEL, SCD/Halo) для анализа фрагментации ДНК сперматозоидов;

- HOS test (hypo-osmotic swelling test) – гипоосмотический тест – один из методов определения целостности мембраны клеток (при ее нарушении живые сперматозоиды набухают и скручиваются из-за притока жидкости);

- Proteomics и metabolomics – протеомика – определение профиля экспрессируемых белков в сперматозоидах; метаболомика – идентификация метаболитов в клетках или жидкостях в качестве низкомолекулярных биомаркеров патологических состояний;

- HZA (hemizona assay) – тест связывания с блестящей оболочкой – измерение количества клеток, провзаимодействовавших с блестящей оболочкой яйцеклетки;

- HBA (hyaluronan binding assay) – анализ связывания с гиалуроновой кислотой – выделение гиалуроновой кислотой пула созревших клеток, способных к реакции с лучистым венцом (слоем фолликулярных клеток вокруг яйцеклетки);

- AR (acrosome reaction) – акросомная реакция – индукция акросомной реакции с помощью агглютининов и специальных красителей, подсчет клеток с окрашенной акросомой;

- Hyperactivation – гиперактивация сперматозоидов – измерение подвижности гиперактивированных сперматозоидов, одного из конечных этапов капацитации, с изменением паттерна подвижности клеток (увеличение скорости, и амплитуды движения жгутика);

- CASA (computer-aided sperm analysis) – автоматическое измерение морфологии, подвижности и концентрации сперматозоидов;

- ROS (reactive oxygen species) – измерение активных форм кислорода – измерение концентрации ионов кислорода, свободных радикалов и перекисей, как маркера повреждения клеток и нарушения их функции [Van der Horst, du Plessis, 2017].

Важно подчеркнуть, что большинство новых методов до сих пор не стандартизированы, слишком затратны и трудоемки для рутинного анализа даже применительно к человеку [Van der Horst, du Plessis, 2017].

1.2.1 CASA – автоматический анализ сперматозоидов

Из перечня современных методов, приведенных на Рисунке 1.1, мы использовали метод CASA – автоматический анализ сперматозоидов, поэтому остановимся на нем подробнее.

Понимание важности объективной оценки подвижности мужских половых клеток пришло в середине XX в. Пионеры этого направления – британский биолог лорд Н.М.В. Ротшильд, голландский биофизик К. Ван Дуйн и американский ветеринарный репродуктолог Н.Л. ВанДемарк – пытались ввести новые методы для объективной оценки и возможности математического анализа подвижности сперматозоидов, используя для этого съемку на фото/видео пленку и ручную графическую обработку покадровой траектории [Rothschild, Swann, 1949; VanDemark et al., 1958; Van Duijn, Rikmenspoel, 1960]. Это был чрезвычайно трудоемкий процесс получения и обработки данных. В 1970-е гг. начался переход на цифровые камеры и обработку данных с использованием компьютеров, однако созданные на их основе системы были уникальны – из-за высокой цены их могли приобретать только крупные учреждения.

В середине 1980-х гг. появляется несколько коммерческих систем, ориентированных на нужды IVF лабораторий (CellSoft, CRYO Resources Ltd, USA) и ветеринарии (HTM-2000, Hamilton-Thorne Research, USA). Позже эти системы начали использовать не только для хозяйственно значимых, но и для лабораторных животных (крыс, мышей, хомячков) [Amann, Katz, 2004]. В это же время стала понятна важность CASA как инструмента для оценки различных рисков для сперматозоидов, в том числе, связанных с окружающей средой или определенной профессиональной деятельностью (для человека) [Amann, Katz, 2004].

В настоящее время существует множество коммерческих систем, которые используют конвенциональные методы оценки подвижности: «Аргус-CASA» (ArgusSoft, Россия), Androvision (Minitube, Germany), Crismas (Image House Medical, Denmark), Hamilton Thorne Sperm Analyser (IVOS, CEROS, USA), Sperm Class Analyzer (SCA, Spain), ММС Сперм (Россия), SFA 500-2 (Россия), SQA-V (Medical Electronic System, USA/Israel) и др. В последние годы появляются и некоммерческие проекты со свободным доступом к своим программам. Самый известный из них – ImageJ с плагином для CASA [Wilson-Leedy, Ingermann, 2006].

К основным достоинствам автоматического анализа относят [Yeste et al., 2018; Schubert et al., 2019]:

- точность компьютерного анализа, которая на порядок выше «ручного» анализа;

- автоматизацию измерения подвижности сперматозоидов, которая позволяет получать более объективные и надежные данные и обеспечивает их воспроизводимость;

- информативность, которая обеспечивается тем, что движение клетки можно разложить на несколько составляющих, а также возможностью исследовать особенности субпопуляций клеток;

- возможность (с некоторыми поправками) сравнивать данные разных исследований.

Достоинства метода определили его широкое распространение: количество работ по изучению подвижности сперматозоидов с помощью CASA растет с каждым годом (Рисунок 1.2).

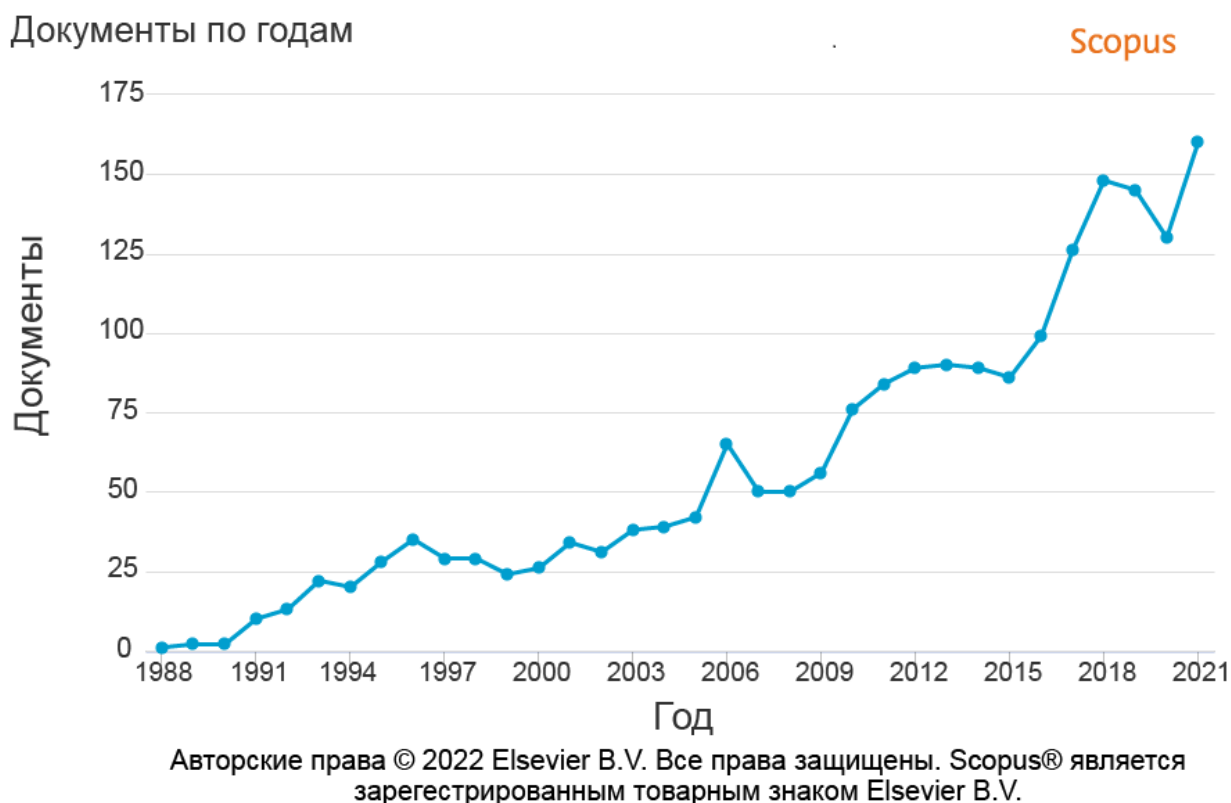


Рисунок 1.2 – Количество статей по подвижности сперматозоидов с использованием CASA (для поиска использовали термины «CASA», «sperm» и «motility»)

Но существует и ряд еще нерешенных проблем (с некоторыми из них мы столкнулись в своей работе, см. главу 4):

- несмотря на стандартизацию, значения для одного и того же показателя, выполненного приборами с различным аппаратным или программным обеспечением, не являются строго сопоставимыми, так как могут иметь различные механизмы (и, соответственно, формулы) расчета [Yeste et al., 2018];

- индивидуальный путь каждого сперматозоида (VCL) может быть вычислен с соответствующей точностью, однако алгоритмы вторичных вычислений обеспечивают понятные, но, возможно, не самые точные или значимые данные [Amann, Katz, 2004];

- границы скоростей клеток (неподвижные/медленные/средние/быстрые) часто устанавливаются произвольно и никак не аргументируются [Amann, Katz, 2004; Tannenbaum, Lee, 2011; van der Horst et al., 2018];

- недостаточность экспериментальной (биологической) базы для проверки обнаруживаемых статистически значимых различий показателей [Amann, Katz, 2004];

- необходимость комплексного анализа подвижности и других показателей сперматозоидов (в том числе морфологических). Так, медленно- и средне-подвижные сперматозоиды с нормальной морфологией могут быть более успешными в оплодотворении, чем быстро-подвижные клетки с морфологическими аномалиями [Amann, Katz, 2004];

- отсутствие стандартов в отношении паттернов движения клеток (известно, что сперматозоиды имеют разные паттерны движения от придатка яичка до яйцеклетки) [Katz et al., 1989]. Кроме того, движение сперматозоидов из одной пробы может различаться в зависимости от глубины камеры и/или состава питательной среды [Katz, Phillips, 1986; Amann, 1988];

- подвижность является необходимой, но не достаточной характеристикой для определения оплодотворяющего потенциала сперматозоида или популяции клеток [Muller, 2000; Amann, Hammerstedt, 2002].

Изначально интерес к разработке CASA был связан с надеждами на «беспрецедентное понимание фундаментальных биологических процессов» при изучении подвижности сперматозоидов, например, на выяснение связи между биохимическими изменениями в сперматозоидах и изменениями их движения [Amann, Katz, 2004]. Однако пока эти надежды не оправдываются, и CASA чаще используют в медицине как инструмент с высокой степенью стандартизации. По мнению R.P. Amann и D.F. Katz (2004), применение CASA наиболее перспективно в области репродуктивной токсикологии и эпидемиологии, поскольку чувствительность этого метода может помочь в оценке влияния различных стрессирующих факторов на подвижность клеток.

Определению показателей эпидидимальных сперматозоидов с использованием CASA посвящены главы 4 и 5 настоящей диссертации.

Глава 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

2.1 Районы исследования

Для исследования влияния химического промышленного загрязнения были выбраны два крупнейших медеплавильных завода Среднего Урала: СУМЗ (Среднеуральский медеплавильный комбинат, г. Ревда) и КМК (Кировградский медеплавильный комбинат, г. Кировград). Предприятия обладают рядом сходных черт, позволяющих проводить корректные сравнения эффектов загрязнения и проверять общность полученных результатов. К ним относятся:

1) сопоставимый (на момент исследования) объем выбросов и спектр приоритетных токсикантов – сернистый ангидрид (SO_2), тяжелые металлы (Cu, Zn, Pb, Cd, Fe, Hg и др.) и металлоиды (As);

2) сформированные в их окрестностях техногенные геохимические аномалии с повышенным в 10–100 раз по сравнению с фоновым содержанием металлов и других элементов в почве [Воробейчик и др., 2006; Трубина и др., 2014; Воробейчик, Пищулин, 2016; Воробейчик, Кайгородова, 2017; Korkina, Vorobeichik, 2018];

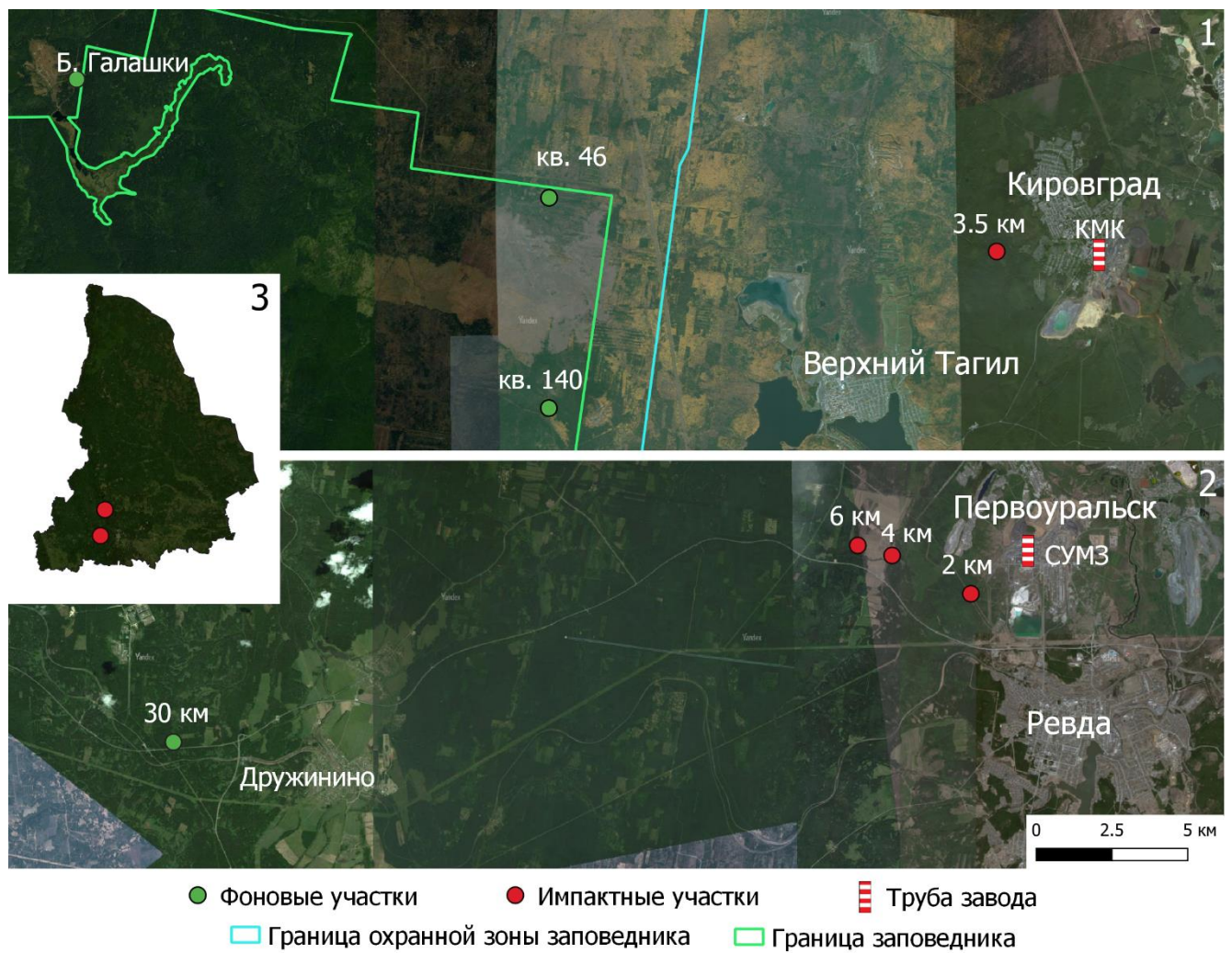
3) расположение в одной ландшафтно-климатической зоне – лесах умеренного пояса, одном зональном природном комплексе – подзоне южной тайги таежной зоны (с преобладанием темнохвойных лесов) западного макросклона Среднего Урала, одном тектогенном природном комплексе – низкогорьях Среднего Урала [Прокаев, 1976; Гурьевских и др., 2016];

4) реорганизация и реконструкция производства в результате которой произошло существенное снижение выбросов [Kozlov et al., 2009; Гос. доклады ... Свердловской области ... 1995–2020 гг.].

В окрестностях обоих заводов сотрудниками лаборатории экотоксикологии популяций и сообществ ИЭРиЖ УрО РАН проводится (в районе СУМЗ с 1990 г., в районе КМК с 2005 г.) комплексный многолетний мониторинг состояния биоты. Широкий по временным рамкам и охвату исследуемых таксонов и уровней

организации корпус знаний позволяет более точно оценивать состояние среды и получать максимально правдоподобную оценку многолетнего (хронического) химического загрязнения.

Пробные площади, расположенные на разном удалении к западу (противоположно господствующему направлению ветров) от заводов, охватывают территории с различной степенью поражения экосистем и образуют градиент промышленного (химического) загрязнения. Мы располагали участки отловов животных в двух контрастных по уровню загрязнения зонах градиента – фоновой (Bg) и импактной (Im) (Рисунок 2.1).



1 – КМК, 2 – СУМЗ, 3 – Свердловская область

Рисунок 2.1 – Схема расположения участков отловов мелких млекопитающих в окрестностях медеплавильных заводов. На врезке – расположение заводов на территории Свердловской области

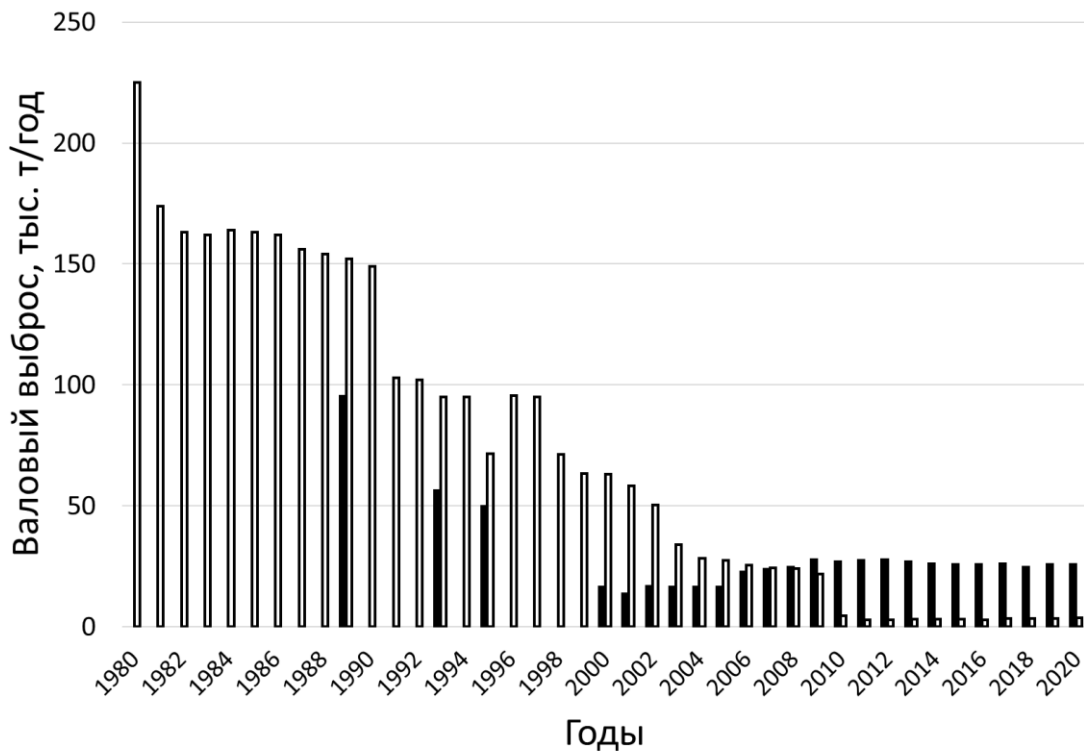
Участки, расположенные фоновой зоне (в 30–40 км от заводов), характеризуют относительно ненарушенное состояние экосистем, которое обусловлено действием только региональных выпадений поллютантов. На импактных участках в непосредственной близости (в 2–6 км) от заводов отмечают структурные перестройки экосистем, вызванные действием локального загрязнения вплоть до крайних вариантов техногенной дигрессии сообществ (техногенные пустоши).

2.1.1 Район СУМЗ

СУМЗ расположен возле г. Ревда Свердловской обл., в 42 км к западу от Екатеринбурга. Предприятие функционирует с 1940 г., основной состав выбросов – газообразные соединения серы, фтора и азота, а также пылевые частицы с сорбированными тяжелыми металлами (Cu, Pb, Zn, Cd, Fe, Hg и др.) и металлоидами (As). Длительность его воздействия на экосистемы на настоящий момент составляет более 80 лет. В 1980-х гг. валовые выбросы СУМЗ достигали 225 тыс. т поллютантов в год, что делало предприятие одним из крупнейших источников промышленного загрязнения СССР. С начала 1990-х выбросы постепенно снижались: к 1999 г. – до 65 тыс. т/год, к 2005 г. – до 27 тыс. т/год, а после коренной реконструкции в 2010 г. – до 3–5 тыс. т/год [Гос. доклады ... Свердловской области ... 1995–2020 гг.] (Рисунок 2.2).

Многолетний мониторинг объектов биоты в районе СУМЗ продолжается уже более 30 лет и охватывает периоды высоких (1990–1997 гг.), сниженных (1998–2009 гг.) и почти прекратившихся (2010–2021 гг.) выбросов [Мухачева, 2021]. Однако, несмотря на многократное снижение выбросов, степень воздействия на экосистемы остается высокой. Исследования динамики компонентов биоты показали, что в непосредственной близости от источника загрязнения продолжается гибель древостоя, отсутствуют восстановительные процессы в травяно-кустарничковом ярусе [Воробейчик и др., 2014; Трубина и др., 2014]. Угнетенное состояние лесных экосистем авторы объясняют крайне медленным очищением верхних горизонтов почвы от тяжелых металлов (и даже увеличением их концентрации), которое связано с сохранением мощного слоя

слаборазложившейся лесной подстилки, и повышением рН, из-за чего, в свою очередь, снижается транзит металлов в нижележащие горизонты [Воробейчик, Кайгородова, 2017; Korkina, Vorobeichik, 2018].



СУМЗ – нет заливки, КМК – темная заливка

Рисунок 2.2 – Объемы валовых выбросов (тыс. т/год) в атмосферу в районах СУМЗ и КМК (1980–2020 гг.). Источники данных: до 1995 г. – Воробейчик и др., 2006, 2017; после 1995 г. – Гос. доклады ... Свердловской области ... 1995–2020 гг.

Фоновые участки для проведения отловов в районе СУМЗ расположены в 30 км от завода, импактные – в 2–6 км (Рисунок 2.1).

На фоновых участках произрастает елово-пихтовый лес с примесью березы (до 20 %). В травянистом ярусе преобладают кислица обыкновенная, папоротник рода щитовник, вейник тростниковидный, сныть обыкновенная и живучка ползучая [Dulya et al., 2019].

На импактных участках произрастает пихново-еловый и елово-пихтовый лес с примесью березы, осины и сосны. В травянистом ярусе преобладают вейник тростниковидный, кислица обыкновенная, вблизи завода абсолютный доминант травянистого яруса – полевица тонкая [Dulya et al., 2019]. В целом с приближением к заводу происходит угнетение древесного яруса, уменьшение

видового богатства и обилия травяно-кустарничкового яруса. Непосредственно у завода древостой сохраняется в виде фрагментов из усыхающих и ослабленных деревьев, видовое богатство травяно-кустарничкового яруса уменьшено до 1–7 видов, значительное развитие получает одновидовой моховой покров из пионерного вида *Pohlia nutans* [Воробейчик и др., 2014].

Исследования сообществ мелких млекопитающих (видовой состав, обилие, разнообразие) в градиенте загрязнения среды за 30-летний период показали отсутствие изменений общего обилия на импактных участках, а на умеренно загрязненных (буферных) – его увеличение в 2 раза [Мухачева, 2021]. На фоновых участках обилие увеличилось в 1.3 раза за счет естественных сукцессионных изменений растительности. Увеличение обилия видов разных трофических групп (фитофагов, семеноядов, зоофагов) в буферной зоне можно считать признаком начальных стадий восстановления вследствие улучшения качества местообитаний.

Для импактных участков в районе СУМЗ показана смена доминатов в сообществе грызунов: в период высоких и снижавшихся выбросов доминировала рыжая полевка, в период прекращения выбросов – красная полевка. При этом общее обилие лесных полевок не изменилось, а суммарное обилие было в 2–4 раза ниже фонового [Мухачева, 2021]. В целом, большинство наблюдаемых изменений на импактных участках было выражено в меньшей степени, чем на буферных участках. К позитивным сдвигам на импактных участках отнесено увеличение обилия бурозубок, что означает постепенное улучшение их кормовой базы в окрестностях завода [Мухачева, 2021]. Так, общее обилие педобионтов увеличилось в 5 раз, а некоторые группы (дождевые черви, энхитреиды, моллюски), ранее отсутствовавшие в импактной зоне, приблизились к заводу [Воробейчик и др., 2019]. При этом темпы восстановления растительного покрова вблизи СУМЗ незначительны [Воробейчик и др., 2014; Трубина и др., 2014], улучшения кормовой базы для фитофагов не произошло, что объясняет многолетнюю стабильность суммарного обилия лесных полевок [Мухачева, 2021].

2.1.2 Район КМК

КМК расположен в г. Кировоград Свердловской области, примерно в 72 км к северо-северо-западу от Екатеринбурга. Это один из старейших медеплавильных заводов Урала, его история началась с запуска Калатинского завода в 1914 г. Современное название предприятия – «Производство полиметаллов», филиал ОАО «Уралэлектромедь». Длительность его воздействия на экосистемы на настоящий момент составляет 108 лет.

Общая структура выбросов КМК сопоставима со структурой выбросов СУМЗ, но в составе неорганической пыли среди тяжелых металлов преобладает не медь с цинком, а свинец. Общая масса выбросов КМК в 1989 г. составляла 95 тыс. т, в 1993 г. – 56 тыс. т. За период с 1995 по 2005 гг. общая масса выбросов сократилась приблизительно в 3 раза (в 2005 г. – 15 тыс. т), но затем вновь произошел их рост – до 25 тыс. т ежегодно [Гос. доклады ... Свердловской области ... 1995–2020 гг.] (Рисунок 2.2).

В 10 км к юго-западу от КМК расположен еще один источник загрязнения – Верхнетагильская ГРЭС, действующая с 1956 г. До реконструкции в ее выбросах преобладала щелочная кальцийсодержащая пыль. С 2016 г. произошло резкое снижение объема выбросов ВТГРЭС (более чем на 90 %, до 2 тыс. т) за счет перехода со сжигания угля на газ [Гос. доклады ... Свердловской области... 1995–2020 гг.]. Выбросы электростанции повышают pH почв, что снижает миграционную активность тяжелых металлов [Воробейчик и др., 2006].

Уникальным для района с высоким уровнем концентрации промышленного производства было создание особо охраняемой природной территории: с 1946 по 1951 гг. здесь существовал заповедник «Висим», с 1971 г. – Висимский государственный природный заповедник, который в 2001 г. получил статус биосферного. Исследования териофауны заповедника, в том числе, не связанные с проблемой влияния прилегающих промышленных предприятий, ведутся около 70 лет. Например, в монографию, посвященную рыжей полевке [Европейская рыжая полевка, 1981], вошли материалы «висимских» зоологических учетов (1948–1949 гг.) М.Я. Марвина.

Исследования влияния загрязнения на территории, прилегающие к КМК, начались еще в 1970-е гг. [Лукьянец, Шелковникова, 1975; Лукьянец, 1979; Лукьянов, Лукьянова, 1990; Марин, 1990, 1992, 1996; Лукьянова, Лукьянов, 1998а, 1998б]. С 2005 г. комплексные исследования ведутся также сотрудниками лаборатории экотоксикологии популяций и сообществ. Большая часть пробных площадей расположена на профиле «г. Кировград – д. Большие Галашки», заложенном Ю.Ф. Мариным (заместитель директора Висимского заповедника по научным вопросам в 1981–2007 гг.) в 1989 г. для отбора снеговых проб.

Отловы животных ведутся на фоновых участках (Галашкинский, Сутукский, Верхнесулемский), расположенных на территории заповедника, и импактных частях градиента загрязнения (Кировградский участок) (Рисунок 2.1). Каждый из четырех участков имеет ряд особенностей.

Галашкинский участок (удален от КМК на 35 км) расположен в крайней западной части заповедника (кв. 21) и в окрестностях д. Большие Галашки. Работы ведутся во вторичных пихтово-еловых и смешанных лесах кустарничково-разнотравных.

Сутукский участок (18 км от КМК) находится в наиболее высокой юго-восточной части заповедника (кв. 140) и характеризуется перепадами высот 250–300 м и максимальной высотой 699 м над у. м. (гора Большой Сутук). На Сутукском участке сохранились основные массивы коренных пихтово-еловых лесов. Биотопы представляют собой коренные пихто-ельники высокотравно-папоротниковые и разнотравные.

Верхнесулемский участок (18 км от КМК) расположен в северной части заповедника (кв. 46) в верховьях р. Сулем, преобладающие типы леса – влажные ельники мелкотравные. Исследуемые биотопы – пихтово-еловые, елово-березовые, и смешанные леса хвоцево-мелкотравно-вейниковые с развитым моховым покровом. Подлесок не выражен и состоит из единичных кустов малины и шиповника.

Отличия Кировградского участка (расположен в окрестностях г. Кировград, 3.5 км от КМК) от других участков градиента связаны с высокой степенью

антропогенного воздействия на типичные южно-таежные ландшафты и выражаются в деградации почв, сведении и замещении коренных пихтово-еловых лесов производными, наличием рудеральных пространств, формировании своеобразного микроклимата (более теплого и влажного по сравнению с прилегающими территориями). На участке произрастает пихтово-еловый лес с примесью сосны, рябины, елью и пихтой в подросте, кустарничково-разнотравным ярусом.

Ежегодный (с 1994 г.) мониторинг населения мелких млекопитающих ведется только на Сутукском участке, на остальных участках наблюдения до последнего времени (2018 г.) носили нерегулярный характер. Для Сутукского участка показаны изменения в многолетней динамике численности мелких млекопитающих: до 2006/2007 г. регистрировали циклический режим динамики (трехлетний цикл с чередованием фаз «депрессии», «роста» и «пика»), затем – нециклический («квази»-двухлетний) режим с более выраженными сезонными изменениями численности животных [Кшнясев, Давыдова, 2005, 2021]. В 2018 г. наблюдали резкий спад численности грызунов, который, по-видимому, привел к возвращению трехлетнего циклического режима (на Сутукском участке среднегодовая численность грызунов составила 0.75 ос./100 лов.-сут.). Глубокую депрессию численности грызунов и бурозубок отмечали на других участках Висимского заповедника [Лукиянова и др., 2021] и в других районах Среднего и Южного Урала (устные сообщения коллег).

2.2 Характеристика модельных видов грызунов

Мелкие млекопитающие – как инструмент экологического мониторинга – могут служить для биоиндикационных целей благодаря относительно небольшому участку обитания, интенсивному размножению, высокой численности и эврибионтности [Sheffield et al., 2001].

Для изучения влияния химического загрязнения исследовали три вида грызунов (Rodentia) из двух семейств: рыжую полевку (*Clethrionomys glareolus* Schreber, 1780) и красную полевку (*Clethrionomys rutilus* Pallas, 1779)

подсемейства Arvicolinae семейства Cricetidae [Kryštufek et al., 2020], и малую лесную мышь (*Sylvaemus uralensis* Pallas, 1811) подсемейства Murinae семейства Muridae [Павлинов, Хляп, 2012]. Эти виды обычны для территории Среднего Урала и часто доминируют в локальных таксоценозах.

Рыжая полевка – эвритопный вид, обитающий на обширных пространствах лесной и лесостепной зон Евразии и часто доминирующий в сообществах грызунов, особенно в европейских хвойно-широколиственных лесах [Европейская рыжая полевка, 1981; Карасева, Телицина, 1996]. Рыжая полевка экологически пластична и питается самым широким спектром кормов. Вид имеет европейское происхождение и распространен в лесах Европы от севера Пиренейского полуострова до среднего Енисея, на Британских островах, на севере Малой Азии, в Западной Сибири – в полосе южной тайги, доходящей до Алтая, Западного Саяна [Абрамсон, Лисовский, 2012]. Северная граница в европейской части ареала – до лесотундровой зоны, в Сибири северная граница южнее – в районе 55 параллели. На Урале распространена широко, но неравномерно. В Предуралье может заходить к северу в лесотундровую зону, в Зауралье – изредка проникает в подзону средней тайги [Европейская рыжая полевка, 1981; Большаков и др., 2000; Бердюгин и др., 2007].

Красная полевка – также эвритопный, но более криофильный вид по сравнению с рыжей полевкой. Заселяет зоны тайги и широколиственных лесов; на севере проникает в лесотундру, а на юге – в островные леса и лесостепи. Красная полевка на большей части ареала более семяноядный вид по сравнению с рыжей полевкой [Карасева, Телицина, 1996]. В местах совместного обитания часто уступает по численности рыжей полевке [Кошкина, 1957; Окулова, Мясников, 1979; Европейская рыжая полевка, 1981]. *Cl. rutilus* имеет восточноазиатское происхождение и встречается в зоне тайги Евразии от Дальнего Востока до Скандинавии, в тундре и северной тайге Северной Америки – вплоть до западного побережья Гудзонова залива [Бородин, 1988; Абрамсон, Лисовский, 2012; Kohli et al., 2015]. Южная граница в Евразии захватывает верховья Волги, бассейн Камы, облесенную часть Урала, северный Казахстан и Казахский мелкосопочник, Алтай,

Саяны, Хангай, Хэнтей, Большой и Малый Хинганы, Чанбайшань, Ляодунский полуостров, Сахалин, Курильские и Японские острова, в Северной Америке к югу примерно до 60 параллели [Соколов, Орлов, 1980; Zhang et al., 1997; Shenbrot, Krasnov, 2005; Абрамсон, Лисовский, 2012].

Средний Урал считают зоной симпатрии красной и рыжей полевок. Описаны случаи древней и современной гибридизации *Cl. glareolus* и *Cl. rutilus* [Tegelström, 1987; Осипова, Соктин, 2008; Абрамсон и др., 2009; Бородин и др., 2011]. Новые методы экспресс-оценки мтДНК и яДНК показали, что естественная современная гибридизация не уникальна, но довольно редка [Сибиряков и др., 2021].

На периферии ареала у лесных полевок наблюдают регулярную цикличность подъемов и спадов численности, тогда как в оптимуме ареала она отсутствует [Krebs, 1966; Бернштейн и др., 1987; Иванкина, 1987; Кшнясев, Давыдова, 2021].

Малая лесная мышь предпочитает смешанные и широколиственные леса. Этот вид – семенояд, но в его рационе постоянно присутствуют животные корма и небольшое количество вегетативных частей растений. *S. uralensis* встречается в умеренных широтах восточной Европы и Западной Сибири. На севере – от верховий бассейна р. Великой к крайнему югу Карелии, Среднему Уралу и устью Тобола; на восток – до Иртыша [Павлинов, Хляп, 2012].

S. uralensis включает 2 полувида (*uralensis* и *kastschenkoi*), северная часть границы между ними проходит по Иртышу [Межжерин, 1997а, 1997b; Богданов и др., 2009; Карамышева и др., 2010]. В свою очередь, у *S. uralensis* различают 2 формы – северную и южную [Атопкин и др., 2007; Балакирев и др., 2007; Богданов и др., 2009] (ранее их рассматривали как виды *mosquensis* и *ciscaucasicus*). Эти формы можно рассматривать как подвиды, граница между ними проходит в северном Предкавказье [Карамышева и др., 2010; Стахеев и др., 2011]. На Среднем Урале малая лесная мышь представлена северной формой полувида *uralensis*.

2.3 Отлов, содержание и обследование грызунов

При учетах мелких млекопитающих обычно используют метод ловушко-линий [Карасева, Телицина, 1996]. Этот метод позволяет оценивать количественное соотношение видов, выделять виды-доминанты, определять относительную численность и пространственное распределение, а также получать адекватную выборку для определения различных популяционных характеристик – демографических, репродуктивных, морфофизиологических и т. д.

Мы также использовали линейный способ размещения ловушек – на каждом участке размещали по две–три линии живоловок (по 20–30 шт. каждая) на расстоянии 5–10 м друг от друга. Однако для увеличения необходимых нам выборок (половозрелых самцов модельных видов грызунов) использовали схему «максимального вылова» животных: после срабатывания (поимки животного) ловушку снова устанавливали в рабочее состояние, в отличие от классической схемы, при которой ловушка в течение суток может сработать только один раз. Ловушки экспонировали 3–5 суток и проверяли ежедневно утром и вечером. Таким образом, были получены выборки необходимого объема, но оценки численности оказались несколько смещенными (в сторону увеличения).

Систематические отловы в районах СУМЗ и КМК проводили в 2018–2021 гг. с мая по август. В 2020 г. отловы проводили чаще, что позволило исследовать широкий спектр онтогенетической изменчивости показателей сперматозоидов грызунов и собрать массовый материал.

В обоих районах выполнен почти одинаковый объем работ (Таблица 2.1). Наибольшие ловчие усилия (53 % от всего объема работ) применены в 2020 г.: отработано 1300 ловушко-суток в районе СУМЗ и 1407 ловушко-суток в районе КМК. За этот период отловлено 832 экз. мелких млекопитающих, из них: 377 экз. бурозубок, 401 экз. полевков разных видов, 54 экз. малой лесой мыши.

Таблица 2.1 – Абсолютная численность мелких млекопитающих в районе СУМЗ и КМК в 2018–2021 гг.

Район	Зона загрязнения	Участок	Год	Дата начала отловов	Кол-во ловушко-суток	<i>Cl. glareolus</i>	<i>Cl. rutilus</i>	<i>S. uralensis</i>	Всего грызунов	Всего бурозубок
СУМЗ	Фооновая	30 км	2018	23.07	126	4	1	0	6	8
			2019	15.07	(200)	37	0	5	43	99
			2020	19.05	(400)	45	1	3	49	10
			<i>Всего</i>		726	86	2	8	98	117
	Импактная	6 км	2018	20.07	(130)	6	3	4	13	1
		4 км	2018	20.07	(48)	5	1	1	7	0
			2019	15.07	(75)	0	7	5	12	24
			2020	02.06	(250)	10	3	3	18	31
			2020	23.07	(200)	12	20	5	43	46
		1–2 км	2018	23.07	162	0	0	0	0	8
			2019	15.07	(99)	0	0	0	0	1
			2020	02.06	(250)	1	6	1	8	11
			2020	23.07	(200)	1	7	2	10	45
		<i>Всего</i>		1414	35	47	21	111	167	
КМК	Фооновая	Галашкинский	2019	05.08	(200)	18	3	3	24	79
			2020	06.07	(300)	4	7	0	11	0
		Верхне-сулемский	2018	28.05	150*	0	0	0	0	0
			2019	05.08	(232)	4	9	1	22	182
		Сутукский	2020	06.07	(243)	17	17	1	53	87
			2018	28.05	150*	0	0	0	0	0
			2018	03.08	150*	0	0	0	0	1
			2018	02.10	120*	2	2	0	4	31
			2019	26.08	150*	36	10	3	67	52
			2020	16.05	150*	18	5	9	45	7
	2020		10.08	150*	36	8	6	68	32	
	2020	19.09	120*	59	9	12	90	30		
	2021	24.05	50*	1	0	0	1	0		
	2021	19.09	75*	2	0	0	2	2		
	<i>Всего</i>		2240	197	70	35	387	503		
	Импактная	Кировградский	2019	26.07	(275)	0	10	1	16	39
			2020	18.06	(444)	25	22	12	60	78
<i>Всего</i>			719	25	32	13	76	117		
ИТОГО					5099	343	151	77	672	904

Примечание – В скобках приведено условное количество ловушко-суток (при схеме с «максимальным выловом»); * – учеты Ю.А. Давыдовой

В работе использовали также материалы отловов С.В. Мухачевой в июле 2019 г. (в сводную Таблицу 2.1 не включены). Самцы (10 особей рыжей полевки, 9 – красной полевки, 2 – малой лесной мыши) были пойманы на «смешанной» линии, состоящей из давилок и живоловок, протяженностью в несколько километров, в 2–4 км от СУМЗ.

Для отловов использовали деревянные трапиковые живоловки (210x88x85 мм) с жилой камерой и отделением для приманки, подходящие для кратковременного пребывания в них грызунов в условиях Среднего Урала. Для утепления в ловушки подкладывали сухой мох или травянистую ветошь. Пойманных животных содержали в металлических сетчатых клетках-переносках Triol (China), размером 280x190x140 мм. Клетки заполняли по мере поимки (до 4–6 особей). Животных без признаков конфликтов не рассаживали. После поимки животных доставляли в лабораторию для обследования: измерения, взвешивания, определения массы внутренних органов и отбора биологических образцов.

Грызунов содержали 1–3 дня в условиях лаборатории при естественном освещении и комнатной температуре, стараясь максимально быстро рассадить животных по 1–3 особи в пластиковые клетки-садки (400x245x155 мм) с сетчатой крышкой. Передержка животных помогала снизить влияние стресса от перевозки и новой обстановки. Животных кормили (*ad libitum*) овсом, морковью, огурцами и яблоками, для подстилки использовали древесные опилки и сено.

Животных умерщвляли разрывом шейных позвонков. У самцов определяли массу и индекс (отношение массы к длине) тела (TANITA 1479V, Japan, точность 0.1 г), массу семенников и придатков (эпидидимисы, семенные пузырьки, препуциальная и предстательная железы) (TANITA 1210, Japan, точность 0.002 г). Для морфофизиологического анализа использовали среднее значение массы у парных органов (семенников и эпидидимисов), а также рассчитывали индексы семенников и других органов (отношение массы органа к массе тела).

Все процедуры, выполняемые при работе с животными, соответствовали этическим нормам Института экологии растений и животных РАН (Протокол № 4 от 26.01.2021).

2.4 Численность и структура популяций модельных видов

Выборки частично отражали состояние населения мелких млекопитающих в окрестностях СУМЗ и КМК в период исследования (2018–2021 гг.). На участках с разным уровнем загрязнения численность грызунов различалась. На фоновых участках она была выше в 1.6–1.7 раза по сравнению с импактными и составляла: для СУМЗ – 13.5 и 7.9 ос./100 лов.-сут., для КМК – 17.3 и 10.6 ос./100 лов.-сут., соответственно.

Исследуемые виды были представлены на всех участках. Однако на фоновых территориях обоих районов среди грызунов преобладала рыжая полевка (88 (67–92) % для СУМЗ, 51 (18–100) % для КМК), на долю красной полевки приходилось в среднем 10 % (2 (0–17) % для СУМЗ, 18 (0–64) % для КМК). В импактной зоне доля красной полевки возрастала в среднем до 42 % (14–75 % для СУМЗ, 37–63 % для КМК). На участке вблизи СУМЗ (2 км от завода) во все годы наших наблюдений доминировала красная полевка (70–75 % от всех грызунов).

В 2019 г. на импактном участке в районе СУМЗ (4 км от завода) не было поймано ни одной рыжей полевки, хотя в другие годы ее численность составляла от 28 до 72 % от общего количества грызунов. Наоборот, на Кировоградском участке в 2019 г. полностью отсутствовала рыжая полевка.

Малая лесная мышь на всех участках была малочисленна, ее доля в учетах составляла от 0 до 20 %, единственный максимум (42 %) был зарегистрирован в 2019 г. на импактном участке (4 км от завода) в районе СУМЗ.

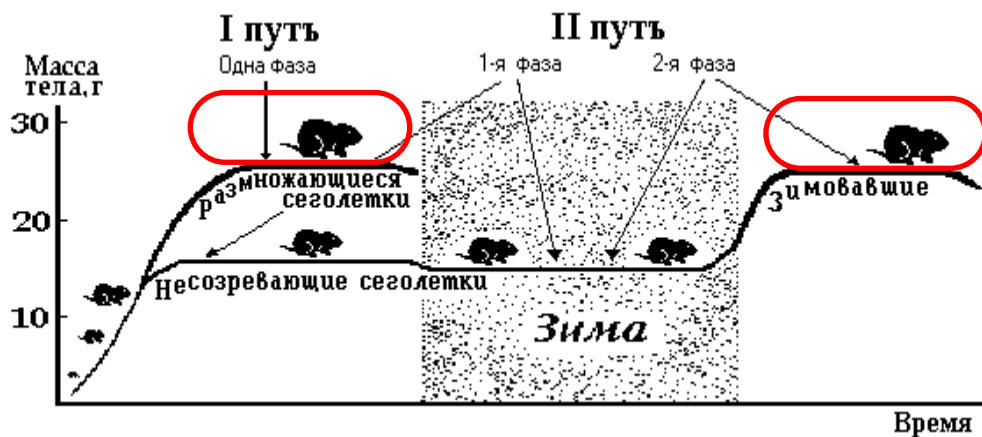
В среднем в обоих районах за исследуемый период доля грызунов составляла: для рыжей полевки – 51 %, красной полевки – 22 %, малой лесной мыши – 11 %.

Межгодовые различия численности грызунов позволили выделить годы с низкой (2018, 2021 гг., 3 (1–6) ос./100 лов.-сут.), средней (2019 г., 13 (6–22) ос./100 лов.-сут.) и высокой численностью (2020 г., 16 (9–28) ос./100 лов.-сут.) и отнести их к фазам «депрессии», «роста» и «пика» популяционного цикла. Эта классификация согласуется с обозначением этих лет/фаз другими териологами,

работающими в этих районах [Кшняев, Давыдова, 2021; Лукьянова, 2021; Лукьянова и др., 2021; Мухачева, Созонтов, 2021].

Для выделения популяционных групп использовали функционально-онтогенетический подход, предложенный Г.В. Оленевым (1989, 2002, 2009) и основанный на поливариантности (бивариантности) онтогенеза мышевидных грызунов. Основным критерий выделения – функциональное единство (специфика роста, развития и репродуктивного состояния) особей в группах, соответствующих двум вариантам онтогенеза.

Особи I варианта («пути» по Г.В. Оленеву (2002, 2009)) онтогенеза – *половозрелые сеголетки* (размножающиеся в год своего рождения) – характеризуются монофазным ростом, быстрым созреванием и вступлением в размножение, быстрым метаболизмом и старением (Рисунок 2.3). Их основная функция в популяции – «наращивание численности» в текущем сезоне размножения [Оленев, 2002].



○ – две анализируемые группы половозрелых грызунов

Рисунок 2.3 – Схема двух альтернативных путей онтогенетического развития мышевидных грызунов, цит. по [Оленев, 2009]

Ко II варианту онтогенеза относятся особи с бифазным ростом. *Неполовозрелые сеголетки* (несозревающие в год своего рождения, 1-ая фаза) характеризуются сниженным метаболизмом и замедленной (почти в два раза по сравнению с половозрелыми сеголетками) скоростью роста. Эту группу считают наиболее устойчивой к широкому спектру неблагоприятных воздействий, ее

основная функция – сохранение популяции до следующего сезона размножения. Во 2-ой фазе развития (после зимовки) *перезимовавшие особи* характеризуются быстрым созреванием и достижением дефинитивного состояния, скорость их метаболизма и старения сходна с половозрелыми сеголетками. Основная функция этой группы – после перезимовки «начать цикл обновления популяции» [Оленев, 2002].

Таким образом, отловленных самцов по комплексу признаков (масса и размер тела, наличие тимуса, состояние половых желез) дифференцировали на популяционные группы:

- неполовозрелые сеголетки (immature, im);
- половозрелые сеголетки (mature, m);
- перезимовавшие особи (overwintered, ow).

В анализе показателей сперматозоидов использовали животных двух групп – половозрелых сеголеток и перезимовавших особей (Рисунок 2.3).

Половозрелость самцов определяли по степени развитости (массе и размерам) семенников и придаточных желез и наличию сперматозоидов в эпидидимисе. Для верификации определения группы у всех отловленных грызунов по возрастным изменениям зубов был определен абсолютный возраст: для полевок с точностью до 10–45 дней [Оленев, 2009], для малой лесной мыши – до 10–142 дней [Колчева, 1992].

Во всех случаях в анализ показателей сперматозоидов включали половозрелых самцов без видимых признаков инволюции семенников и придаточных желез (Рисунок 2.4). Исключение – анализ онтогенетической изменчивости морфологических показателей сперматозоидов (раздел 3.1), в котором отдельно учитывали также группу сеголеток с инволюцией половых желез (m/i).



- 1 – семенные пузырьки (*vesiculae seminales/glandulae vesiculosae*); 2 – мочевого пузыря (*vesica urinaria*); 3 – семявыносящий проток (*vas/ductus deferens*); 4 – семенник (*testis*);
 5 – предстательная железа (*prostata*); 6 – хвост придатка семенника (*cauda epididymis*);
 7 – пенис (*penis*)

Рисунок 2.4 – Фотография мужской половой системы *Cl. glareolus*

Структура популяций модельных видов также различалась в разные годы (Таблица 2.2). Специфику итоговых выборок определили особенности репродуктивно-возрастной структуры в разные фазы популяционного цикла. Так, в 2020 г. отмечали существенное снижение доли половозрелых сеголеток, что можно связать с характерным для пика численности эффектом Калелы–Кошкиной – подавлением созревания сеголеток при высокой весенней плотности перезимовавших животных [Kalela, 1957; Кошкина, 1957; Кшнясев, Давыдова, 2005].

Следует подчеркнуть, что выполненные полевые работы охватывали лишь один популяционный цикл динамики мелких млекопитающих. Небольшое число лет наблюдений и отсутствие повторностей (всего два года «депрессии» и по одному году «роста» и «пика») не позволило в полной мере оценить связь

репродуктивных характеристик самцов с динамикой численности. Однако в отдельных случаях (например, при анализе встречаемости аномальных сперматозоидов у рыжей полевки) мы смогли учесть межгодовую изменчивость показателей [Смирнов, Давыдова, 2018]. В настоящей работе межгодовая изменчивость показателей сперматозоидов не обсуждается.

Таблица 2.2 – Половая и репродуктивно-возрастная структура популяций модельных видов в районе СУМЗ и КМК в 2018–2021 гг.

Вид	Район	Участки	Год	Самцы/самки (экз.)	Неполовозрелые сеголетки/половозрелые сеголетки/перезимовавшие особи (экз.)
<i>Cl. glareolus</i> , <i>n</i> = 385	СУМЗ	Фоновые	2018	3/1	0/2/2
			2019	22/15	22/8/7
			2020	25/20	0/0/45
			2021	-	-
		Импактные	2018	7/4	2/5/4
			2019	0/0	0/0/0
			2020	17/7	10/2/12
			2021	-	-
	КМК	Фоновые	2018	1/1	0/2/0
			2019	34/24	36/20/2
			2020	79/55	105/0/23
			2021	2/1	1/1/1
		Импактные	2018	-	-
			2019	0/0	0
			2020	16/9	8/12/5
			2021	-	-
<i>Cl. rutilus</i> , <i>n</i> = 155	СУМЗ	Фоновые	2018	1/0	0/1/0
			2019	0/0	0/0/0
			2020	1/0	0/0/1
			2021	-	-
		Импактные	2018	2/2	0/3/1
			2019	4/3	1/6/0
			2020	18/18	9/16/11
			2021	-	-

Продолжение таблицы 2.2

Вид	Район	Участки	Год	Самцы/самки (экз.)	Неполовозрелые сеголетки/ половозрелые сеголетки/перезимовавшие особи (экз.)
	КМК	Фоновые	2018	2/0	2/0/0
			2019	13/9	9/12/1
			2020	32/14	36/2/8
			2021	0/0	0/0/0
		Импактные	2018	-	-
			2019	7/3	0/7/3
			2020	10/12	8/5/9
			2021	-	-
<i>S. uralensis</i> , <i>n</i> = 79	СУМЗ	Фоновые	2018	0/0	0/0/0
			2019	3/2	0/3/2
			2020	1/2	0/0/3
			2021	-	-
		Импактные	2018	3/2	0/4/1
			2019	3/2	1/4/0
			2020	4/7	10/0/1
			2021	-	-
	КМК	Фоновые	2018	0/0	0/0/0
			2019	3/4	3/3/1
			2020	13/15	20/1/7
			2021	0/0	0/0/0
Импактные		2018	-	-	
		2019	1/0	0/1/0	
		2020	9/3	2/7/3	
		2021	-	-	

Примечание – «-» отловы не проводили; полужирным шрифтом выделены половозрелые особи

2.5 Морфофизиологические характеристики самцов

Морфофизиологические (в том числе репродуктивные) показатели самцов исследуемых видов различаются у разных популяционных групп [Давыдова, 2007; Давыдова и др., 2009; Нестеркова и др., 2012]. В качестве примера

приведены абсолютные и относительные массы тела и половых желез для самцов из самых массовых сборов (2019–2020 гг.) на фоновых участках (Таблица 2.3).

Таблица 2.3 – Абсолютные и относительные массы тела и половых желез самцов модельных видов грызунов с фоновых участков (2019–2020 гг.)

Вид	Группа	Масса (г) / индекс тела	Масса (мг) / индекс половых желез самцов				
			Семенник	Эпиди- димис	Семен- ные пузырь- ки	Препу- ци- альная железа	Пред- ста- тельная железа
<i>Cl. glareolus</i>	im	$\frac{18.9}{0.21}$ (95)	$\frac{9.7}{0.63}$ (93)	–	–	–	–
	m	$\frac{22.5}{0.24}$ (6)	$\frac{360.5}{16.1 / 2.11}$ (6)	$\frac{43.8}{2.11}$ (6)	$\frac{235.7}{9.03}$ (6)	$\frac{23.4}{1.07}$ (5)	$\frac{39.0}{1.87}$ (4)
	ow	$\frac{27.1}{0.28}$ (40)	$\frac{460.0}{16.30 / 2.34}$ (40)	$\frac{45.6}{1.70}$ (40)	$\frac{269.4}{8.36}$ (40)	$\frac{31.1}{1.16}$ (33)	$\frac{40.3}{1.53}$ (34)
<i>Cl. rutilus</i>	im	$\frac{18.9}{0.21}$ (29)	$\frac{5.0}{0.31}$ (29)	–	–	–	–
	m	$\frac{22.9}{0.24}$ (6)	$\frac{197.5}{7.15 / 1.14}$ (6)	$\frac{22.0}{1.07}$ (6)	$\frac{224.7}{5.50}$ (5)	$\frac{45.8}{2.16}$ (5)	$\frac{27.6}{1.35}$ (5)
	ow	$\frac{30.9}{0.30}$ (7)	$\frac{265.0}{8.58 / 1.22}$ (7)	$\frac{32.2}{1.10}$ (7)	$\frac{303.4}{8.64}$ (7)	$\frac{93.0}{3.01}$ (7)	$\frac{51.1}{1.65}$ (7)
<i>S. uralensis</i>	im	$\frac{14.5}{0.18}$ (10)	$\frac{22.0}{2.04}$ (10)	–	–	–	–
	m	$\frac{21.2}{0.24}$ (3)	$\frac{241.0}{8.56 / 1.48}$ (3)	$\frac{21.3}{1.23}$ (3)	$\frac{230.7}{10.90}$ (3)	–	–
	ow	$\frac{22.8}{0.25}$ (5)	$\frac{249.6}{9.29 / 1.45}$ (5)	$\frac{21.3}{0.95}$ (5)	$\frac{215.6}{7.8}$ (5)	$\frac{16.5}{0.72}$ (2)	$\frac{21.0}{0.98}$ (3)

Примечание – Популяционная группа: im – неполовозрелые сеголетки, m – половозрелые сеголетки, ow – перезимовавшие особи; в скобках указано количество особей; для парных органов (семенников и эпидидимисов) приведено среднее значение; группы половозрелых самцов (m, ow) не включали особей на стадии созревания или с возрастной инволюцией половых органов; прочерк означает отсутствие данных. Для половозрелых самцов также приведены (через слеш) два индекса семенника: 1) отношение массы органа к массе тела и 2) отношение наблюдаемой массы семенника к его прогнозируемой массе, цит. по [Kenagy, Trombulak, 1986]

У близкородственных рыжей и красной полевков при одинаковых массе/индексе тела массы/индексы репродуктивных органов различались. Например, масса семенника у рыжей полевки была больше, чем у красной: у половозрелых сеголеток в 1.8 (индекс семенника – в 2.3) раза, у перезимовавших особей – в 1.7 (индекс семенника – в 1.9) раза. Таксономические различия обычно связывают с разными репродуктивно-экологическими стратегиями видов/таксонов [Gómez Montoto et al., 2011a, 2011b; Амбарян и др., 2015; Lüpold et al., 2020].

В Таблице 2.3 приведены два варианта индекса семенника: 1) отношение массы органа к массе тела [Шварц и др., 1968]; 2) отношение массы семенника к его прогнозируемой массе (индекс конкурентности по G.J. Kenagy и S.C. Trombulak (1986) интерпретируют как оценку уровня конкуренции между самцами). Индекс конкурентности рассчитывают по формуле (1):

$$M_{\text{относит.}} = M_{\text{семенник}} / M_{\text{прогноз.}} \quad (1)$$

$M_{\text{относит.}}$ – относительная масса семенника,

$M_{\text{семенник}}$ – наблюдаемая масса семенника.

$M_{\text{прогноз.}}$ – прогнозируемая масса семенника, рассчитываемая по формуле (2):

$$M_{\text{прогноз.}} = 0.031 X^{0.77} \quad (2)$$

X – масса тела.

Уровень конкуренции считают высоким при значении индекса выше единицы [Kenagy, Trombulak, 1986]. У полевков и малой лесной мыши относительная масса семенника была выше единицы (Таблица 2.3), поэтому все они могут быть отнесены к видам с высоким уровнем конкуренции между самцами. Однако индекс конкурентности у перезимовавших самцов рыжей полевки был выше по сравнению с самцами красной полевки в 2 раза, малой лесной мыши – в 1.6 раза.

2.6 Анализ морфологических показателей сперматозоидов

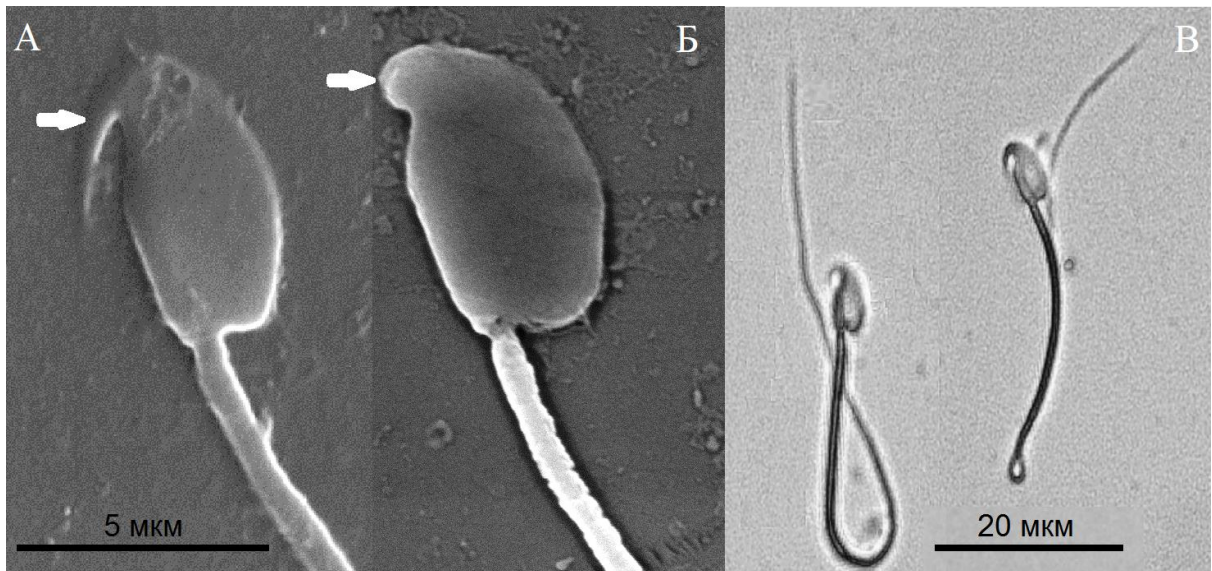
В морфологическом анализе использовали постмортальные эпидидимальные сперматозоиды, поскольку известна их долговременная функциональная сохранность, а соотношение нормальных и дефектных сперматозоидов у трупа на протяжении нескольких дней остается неизменным [Мохаммадзаде и др., 2011].

Для исследования морфологии сперматозоидов готовили препараты из содержимого хвостовой части правого эпидидимиса: суспензию неокрашенных клеток наносили на предметное стекло и делали мазок, который затем фиксировали в 95 %-ном спирте. Мазковые препараты готовили в 2–3-х повторностях. Клетки фотографировали с помощью микроскопа Leica DM1000 LED и цифровой камеры Leica DFC 295 (Leica Microsystems, Germany) при увеличении $\times 400$ для анализа патологий и $\times 630$ для морфометрических исследований у полевок и при увеличении $\times 200$ и $\times 400$ – у малой лесной мыши.

2.6.1 Анализ встречаемости аномальных сперматозоидов

У грызунов различали три группы сперматозоидов: нормальные (без деформаций структурных элементов клеток), с дефектом головки (включая деформацию акросомы), с дефектом хвоста (различные варианты петель и шпилек) (Рисунок 2.5) [Смирнов, Давыдова, 2018]. Для детализации формы головок сперматозоидов использовали возможности сканирующей электронной микроскопии (SEM). Для SEM от предметных стекол с мазками эпидидимальных сперматозоидов с помощью стеклореза отрезали небольшие квадратные кусочки ($\sim 10 \times 10$ мм). Затем их покрывали распылением 7 нм золота (Q150R ES, Oxford Instruments, UK) и исследовали в микроскопе VEGA II SBU (Tescan, Czech Republic).

У каждого животного исследовали по 200 сперматозоидов: в 15–30 случайных полях зрения определяли долю нормальных и аномальных клеток.



А – с нормальной головкой, Б – с дефектом головки (набухание, деформация акросомы), В – с петле- и шпилькообразными хвостами. Стрелки указывают на область акросомы головки сперматозоида. Изображения А, Б получены с использованием сканирующей электронной микроскопии (VEGA II SBU, Tescan), В – световой микроскопии (Leica DM1000)

Рисунок 2.5 – Сперматозоиды *Cl. glareolus*

2.6.2 Анализ морфометрических показателей сперматозоидов

Для определения морфометрических показателей использовали изображения сперматозоидов и программное обеспечение ImageScore M (Россия, <http://www.microscop.ru>).

Измеряли следующие показатели сперматозоида (Рисунок 2.6):

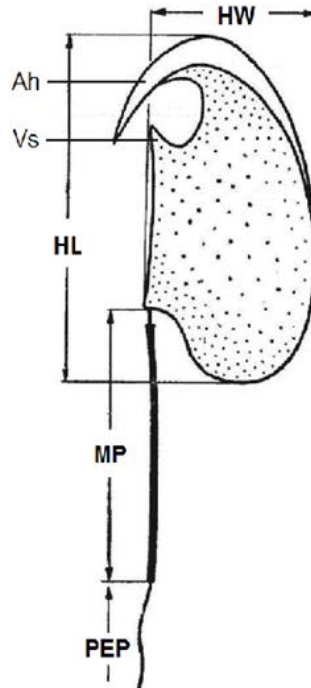
- длину головки (head length, HL) – максимальное расстояние от вершины акросомы до основания головки;
- ширину головки (head width, HW) – максимальное расстояние от вентральной до дорсальной поверхности головки;
- длину средней части хвоста (midpiece length, MP) – расстояние от основания головки до начала основной части хвоста;
- длину основной и конечной частей хвоста (principal and end piece length, PEP) – расстояние от начала основной части до кончика хвоста.

Затем рассчитывали:

- общую длину хвоста сперматозоида (MP + PEP);

- общую длину сперматозоида ($TSL = HL + MP + PEP$);
- различные морфометрические индексы сперматозоида, например отношение длины головки к ее ширине или к средней части хвоста и др.

Измерения проводили только для нормальных сперматозоидов. У каждого животного измеряли по 30 клеток, выбранных случайным образом.



Ah – apical hook, Vs – ventral spike, HL – head length, HW – head width, MP – midpiece length,
PEP – principal and end piece length

Рисунок 2.6 – Модифицированная схема измерений структурных элементов сперматозоида грызунов, цит. по [Аксенова, 1978]

2.6.3 Объем и структура выборок

Для исследования различных аспектов морфологии сперматозоидов использовали выборки грызунов, отловленных в разные годы и в разных локалитетах.

Естественную изменчивость морфологических показателей сперматозоидов, не связанную напрямую с деятельностью человека [Шварц, 1963; Яблоков, 1966], изучали на выборках грызунов с фоновых территорий (раздел 3.1).

1) Меж- и внутривидовую (популяционную и индивидуальную) изменчивость морфометрических показателей сперматозоидов исследовали у грызунов с незагрязненных территорий Среднего и Южного Урала (Таблица 2.4). Кроме модельных видов в анализ включали еще 5 видов грызунов сем. Cricetidae и Muridae, включая лабораторных мышей (СВА) в качестве условно референтной группы, не испытывающей влияние природной среды в течение многих поколений. Подробное описание выборок других видов грызунов приведено в нашей работе [Smirnov et al., 2021].

Таблица 2.4 – Объем выборок модельных видов грызунов с фоновых территорий Среднего и Южного Урала для анализа меж- и внутривидовой изменчивости морфометрических показателей сперматозоидов

Вид	Район	Год	Группа	
			m	ow
<i>Cl. glareolus</i> , <i>n</i> = 120	Пригородный, Нижнесергинский, Ревдинский р-ны Свердловской области; Миасский район Челябинской области	2007, 2010, 2014–2016	41	88
<i>Cl. rutilus</i> , <i>n</i> = 20	Пригородный, Нижнесергинский, Ревдинский р-ны Свердловской области	2012, 2014–2016	11	9
<i>S. uralensis</i> , <i>n</i> = 26	Пригородный, Нижнесергинский, Ревдинский р-ны Свердловской области; Миасский район Челябинской области	2014–2016	2	24

2) Онтогенетическую изменчивость морфологических показателей сперматозоидов (размеры и встречаемость аномальных клеток) исследовали на примере рыжей полевки с фоновых территорий. Выборку составили 7 половозрелых сеголеток (m), 9 сеголеток с инволюцией семенника (m/i) и 56 перезимовавших особей (ow), отловленных на фоновых территориях (Сутукский участок) в 2007–2017 гг. [Смирнов, Давыдова, 2020].

Изменчивость морфологических показателей сперматозоидов, связанную с загрязнением среды (раздел 3.2) также изучали на двух выборках грызунов.

3) Влияние химического загрязнения на морфологические показатели сперматозоидов (размеры и встречаемость аномальных клеток) исследовали на примере рыжей полевки ($n = 55$), отловленной в 2014 и 2016 гг. в районе СУМЗ. На фоновых участках в 2014 г. было отловлено 18 перезимовавших особей и 1 сеголеток, в 2016 г. – 13 перезимовавших особей и 8 сеголеток; на импактных участках в 2014 г. – 1 и 5, в 2016 г. – 4 и 2 особей, соответственно [Давыдова и др., 2017b; Смирнов, Давыдова, 2018].

4) Влияние химического загрязнения на встречаемость аномальных сперматозоидов исследовали у всех трех модельных видов ($n = 141$), отловленных в 2018–2020 гг. в районах СУМЗ и КМК (Таблица 2.5).

Для этой же выборки оценено влияние индивидуальной токсической нагрузки (концентрации тяжелых металлов в печени) на показатели сперматозоидов (раздел 5.2) и выполнен комплексный анализ морфологических (встречаемость аномальных клеток) показателей, а также подвижности и концентрации эпидидимальных сперматозоидов (глава 6).

В дальнейшем эта выборка будет именоваться «основной».

Таблица 2.5 – Объем и структура основной выборки модельных видов грызунов для оценки морфологии (встречаемость аномальных клеток), подвижности и концентрации сперматозоидов и уровней накопления тяжелых металлов в организме (2018–2020 гг.)

Район	Зона загрязнения	<i>Cl. glareolus</i> , $n = 71$		<i>Cl. rutilus</i> , $n = 52$		<i>S. uralensis</i> , $n = 18$	
		m	ow	m	ow	m	ow
СУМЗ	Фоновая	0	24	1	1	2	2
	Импактная	8	11	16	9	4	2
КМК	Фоновая	7	12	6	6	1	3
	Импактная	5	4	6	7	2	2

2.7 Анализ подвижности и концентрации сперматозоидов

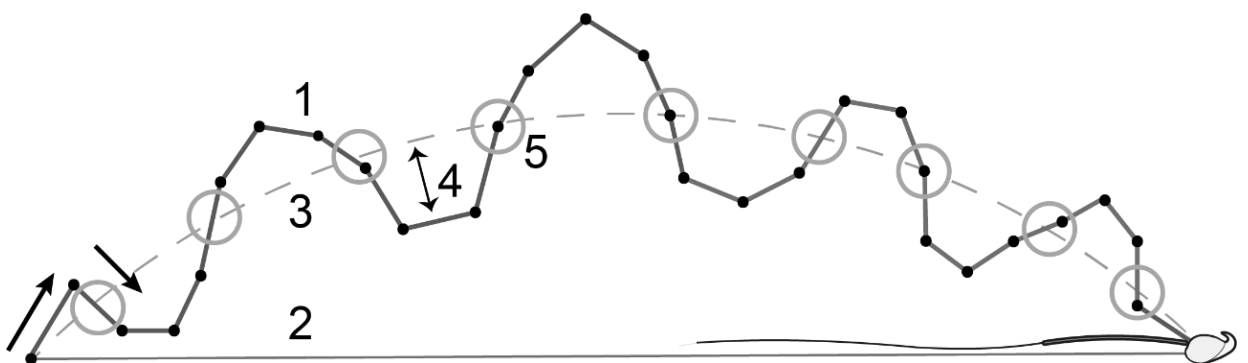
После вскрытия у самцов извлекали эпидидимисы, делали тонкий прокол в их хвостовой части, с помощью микропипетки-дозатора (Proline, Sartorius AG, Finland, 0.1–2.5 мкл) отбирали 0.5 мкл эпидидимальной жидкости и помещали в питательную среду объемом 2 мл на 10–15 мин. Манипуляции с эпидидимисами выполняли под стереоскопическим микроскопом МС-2 (Биомед, Россия). В качестве питательной среды использовали смесь растворов DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, с L-глутамином и глюкозой 4.5 г/л) и 2 % BSA (bovine serum albumin). Оба раствора – производства «БиолоТ», Россия. Смесь DMEM и BSA представляет собой модификацию питательных сред, применяемых для анализа подвижности сперматозоидов лабораторных мышей (Crlj:CD1 (ICR) mice) [Tayama et al., 2006] и рыжих полевок из лабораторной колонии [Kruczek et al., 2013]. Готовую смесь разливали в стерильные микропробирки и помещали на термостатик (Микростат, Техном, Россия) при температуре 37°C.

Готовой суспензией заполняли обе камеры (по 10 мкл суспензии на камеру) предметных стекол (2X-CEL chamber, Hamilton Thorne, USA, глубина камеры 80 мкм) и закрепляли на нагревателе предметных стекол (MiniTherm, Hamilton Thorne, USA) под объективом микроскопа. Для анализа подвижности сперматозоидов использовали правый эпидидимис, кроме двух случаев выраженной асимметрии эпидидимисов (правый орган был в 2 и более раза меньше левого) и двух случаев технической ошибки при отборе проб.

Подвижность измеряли с помощью системы CEROS CASA: специализированной программы MouseTraхх v. 12.3 (Hamilton Thorne, USA), микроскопа (Olympus CX41, Japan) и видеокамеры (Sony XC-ST50, Japan). Движение сперматозоидов снимали при увеличении объектива х4 на 30 последовательных кадрах при скорости 60 кадр/с в 3-х и более полях зрения. Клетки, попавшие только в часть отснятых кадров, в анализ не включали. Анализировали в среднем 450 (240–1782) треков движения сперматозоидов на особь. Исследовали долю подвижных клеток и показатели их движения (Таблица 2.6, Рисунок 2.7).

Таблица 2.6 – Исследованные показатели подвижности сперматозоидов

Обозначение показателя	Расшифровка	Единица измерения	Описание показателя
Motile	Motile cells	%	Доля подвижных клеток
VCL	Curvilinear line velocity	мкм/с	Скорость движения клетки по кривой отснятого трека
VSL	Straight line velocity	мкм/с	Скорость движения клетки по прямой от начала до конца трека
VAP	Average path velocity	мкм/с	Скорость движения клетки по усредненной траектории
ALH	Amplitude of lateral displacement	мкм	Амплитуда отклонения головки сперматозоида от усредненной траектории
BCF	Beat cross frequency	Гц	Частота колебаний головки сперматозоида в секунду
STR	Straightness	%	Прямолинейность усредненной траектории, степень направленности движения клетки, $(VSL/VAP) \times 100$
LIN	Linearity	%	Прямолинейность кривой отснятого трека, степень прямолинейности движения клетки, $(VSL/VCL) \times 100$



1 – скорость криволинейного движения (VCL), 2 – скорость прямолинейного движения (VSL), 3 – скорость движения клетки по усредненному пути (VAP), 4 – амплитуда отклонения головки сперматозоида (ALH), 5 – частота колебаний головки сперматозоида (количество пересечений линии VAP в секунду) (BCF); точки – положение клетки в момент съемки

Рисунок 2.7 – Схема движения сперматозоида и измерения показателей

Мы не дифференцировали подвижные клетки на «медленные» и «прогрессивные», как это принято, например, при анализе сперматозоидов человека, некоторых хозяйственно-значимых и лабораторных животных [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2010; Mortimer et al., 2015; Murphy et al., 2018; Sipilä et al., 2020; Barquero et al., 2021a]. «Медленными» обычно называют неподвижные клетки, или клетки с недостаточно быстрым (относительно других клеток) движением. Считают, что медленное движение неподвижных клеток обусловлено случайными колебаниями (броуновским движением) за счет движения других клеток [Kotula-Balak et al., 2014]. «Прогрессивными» считают сперматозоиды с высокими показателями прямолинейности движения (например, больше 80 %), или сочетанием нескольких показателей – прямолинейности и скорости (например, STR > 80 % и VAP > 100 мкм/с). Однако для дифференциации этих типов (или субпопуляций) клеток используют произвольные значения показателей подвижности, или значения для сперматозоидов человека. Проблема проведения границ между субпопуляциями клеток для большинства видов млекопитающих до сих пор не решена, хотя в последнее десятилетие очевиден тренд увеличения интереса к изучению субпопуляций сперматозоидов [Maree, van der Horst, 2013; van der Horst et al., 2018; Barquero et al., 2021a, 2021b; Valverde et al., 2021]. Пока нет корректного и общепринятого метода определения границ между медленными и прогрессивными клетками для изучаемых нами видов, мы считаем необходимым только упомянуть об этом важном методическом аспекте.

Для определения подвижности сперматозоидов использовали животных из основной выборки (Таблица 2.5).

Значения концентрации сперматозоидов в образцах получали с помощью CASA одновременно со значениями их подвижности.

Приборное определение показателей концентрации дополнительно контролировали с помощью счетной камеры MMC-SR (MMCSOFT, Россия). Для этого дополнительно отбирали пробу эпидидимальной жидкости и разбавляли ее в физиологическом растворе (NaCl, 0.9 %). Затем каплю готовой суспензии с

помощью пипетки помещали в счетную камеру. Клетки фотографировали и считали с помощью микроскопа Leica DM1000 LED и цифровой камеры Leica DFC 295 (Leica Microsystems, Germany) при общем увеличении $\times 200$ в 10 ячейках нанесенной сетки камеры (Рисунок 2.8).



Рисунок 2.8 – Схема определения концентрации сперматозоидов в счетной камере MMC-SR [MMCSofT]

Для пересчета концентрации сперматозоидов из разведенной суспензии в значения для эпидидимальной жидкости (эпидидимата), при ручном и автоматическом определении использовали формулу (3):

$$C = L \times (V1 / Ve) \quad (3)$$

C – концентрация клеток в эпидидимальной жидкости (кл./мл),

L – измеренная концентрация клеток в растворе (DMEM или физиологическом) (кл./мл),

$V1$ – объем питательного раствора (DMEM или физиологического) (мл),

Ve – объем отобранной эпидидимальной жидкости (мл).

Количество сперматозоидов рассчитывали в хвосте правого эпидидимиса по формуле (4), допуская, что он полностью заполнен концентратом клеток, а плотность концентрата составляет 1.06 г/мл. Мы исходили из известных значений

плотности эпидидимальных сперматозоидов человека (1.06–1.10 г/мл), эпителиальных клеток придатка крысы (1.055–1.069 г/мл), эякулята человека (1.043–1.102 г/мл, ее принято сводить к единице) [Oshio et al., 1987; Finaz et al., 1991; WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2010].

$$N = M \times C/\rho \quad (4)$$

N – общее количество сперматозоидов в хвостовой части придатка семенника (кл.),

M – масса эпидидимиса (мг),

C – концентрация клеток в эпидидимальной жидкости (кл./мл),

ρ – плотность эпидидимальной жидкости (мг/мл).

Для определения концентрации сперматозоидов использовали животных из основной выборки (Таблица 2.5).

2.8 Измерение концентраций металлов в организме

Для оценки влияния индивидуальной токсической нагрузки на показатели сперматозоидов определяли концентрации приоритетных (по содержанию в выбросах) загрязнителей (Cu, Zn, Cd, Pb) в печени. Выбор печени определялся известным фактом преимущественного депонирования в ней токсикантов [Ершов, Плетенева, 1989; Świergosz-Kowalewska, 2001; Wu et al., 2016; Andjelkovic et al., 2019; Mammals and birds ..., 2019; Ostoich et al., 2020].

Образцы ткани печени каждого животного сушили при 75°C до воздушно-сухой массы. Затем пробы измельчали и взвешивали на аналитических весах KERN-770 (Germany) с точностью 0.01 мг. Аликвоты около 100 мг помещали в тефлоновые сосуды, содержащие 7 мл 65 % HNO₃ (сверхвысокой чистоты), смешанной с 1 мл деионизированной H₂O, инкубировали в течение 30 мин. и озоляли в микроволновой печи MWS-2 (MWS-2 Berghof, Germany). Затем объем образца доводили до 10 мл деионизированной H₂O. Концентрации тяжелых

металлов (мкг/г сухой массы) измеряли на атомно-абсорбционном спектрометре ContrAA 700 vario (Analytik Jena, Germany) с использованием пламенного (для Cu и Zn) и электротермического (для Cd и Pb) варианта атомизации.

Анализ проводили в лаборатории экотоксикологии популяций и сообществ Института экологии растений и животных УрО РАН. Качество измерений оценивали по международному стандарту бычьей печени BCR-185R (European Commission, Belgium). Процент извлечения составлял в среднем 81.5 % для Cu, 83.6 % для Zn, 94.0 % для Cd и 95.0 % для Pb (Таблица 2.7).

Таблица 2.7 – Концентрации тяжелых металлов в стандартных образцах (мкг/г) и процент их извлечения

Значения концентраций	Cu	Zn	Cd	Pb
Стандарт, проба 1	256.75	119.96	0.490	0.152 / 0.216
Стандарт, проба 2	226.94	113.77	0.497	0.063 / 0.129
Стандарт, проба 3	193.65	113.73	0.547	0.175 / 0.244
Среднее значение	225.78	115.82	0.511	0.163
Сертифицированное значение*	277.00	138.6	0.544	0.172
Извлечение, %	81.5	83.6	94.0	95.0

Примечание – Анализ Cu и Zn выполнен на пламенном атомизаторе, Cd и Pb – на электротермическом; для Pb выполнены повторные измерения стандартных образцов (указаны через слеш); * – сертифицированное значение по [European Commission, Joint Research Centre]

Предельные концентрации обнаружения в пламенном варианте атомизации составляли 0.03 мкг/мл для Cu и 0.015 мкг/мл для Zn, и в электротермическом варианте – 0.0008 мкг/мл для Cd и 0.0025 мкг/мл для Pb. Если концентрация

элемента была ниже предела обнаружения, для статистического анализа использовали значение, равное половине предела обнаружения.

Подготовка образцов печени грызунов, включая озоление, была частично выполнена автором, измерение концентраций элементов в образцах – ведущим инженером-химиком – Э.Х. Ахуновой.

Уровни индивидуальной токсической нагрузки и влияние на них разных факторов определяли в двух выборках:

- первая, расширенная выборка, включала половозрелых самцов и самок модельных видов грызунов ($n = 243$), отловленных в 2017–2020 гг. в районах СУМЗ и КМК (Таблица 2.8);

- вторая состояла только из половозрелых самцов ($n = 141$) и соответствовала основной выборке (Таблица 2.5). Всего выполнено около 1000 элементо-определений.

Таблица 2.8 – Объем выборки для определения концентраций тяжелых металлов в печени модельных видов грызунов в районах СУМЗ и КМК (2017–2020 гг.)

Вид	Район	Участки	Группа	
			m	ow
<i>Cl. glareolus</i> , $n = 137$	СУМЗ	Фоновые	11 / 2	42 / 0
		Импактные	13 / 3	12 / 3
	КМК	Фоновые	10 / 9	17 / 1
		Импактные	10 / 0	4 / 0
<i>Cl. rutilus</i> , $n = 73$	СУМЗ	Фоновые	2 / 0	1 / 0
		Импактные	19 / 1	10 / 2
	КМК	Фоновые	7 / 5	7 / 0
		Импактные	8 / 3	8 / 0
<i>S. uralensis</i> , $n = 33$	СУМЗ	Фоновые	2 / 0	2 / 0
		Импактные	5 / 2	5 / 0
	КМК	Фоновые	3 / 1	3 / 1
		Импактные	7 / 0	2 / 0
Всего			97 / 26	113 / 7

Примечание – Приведено количество самцов / количество самок

2.9 Статистический анализ

Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения STATISTICA 8 [StatSoft, 2007] и среды программирования R (R-project, v. 4.1.1, IDE RStudio v. 1.4.1717) [R Core Team, 2021], а также пакета ggplot2 для визуализации [Wickham, 2016]. Во всех анализах, кроме иерархических моделей дисперсионного анализа (раздел 3.1), статистической единицей была особь.

2.9.1 Анализ естественной изменчивости морфологических показателей сперматозоидов

Анализ меж- и внутривидовой изменчивости сперматозоидов выполнен в разделе 3.1. Значения всех морфометрических показателей сперматозоидов были распределены нормально (тест Шапиро-Уилка). Связь между морфометрическими показателями сперматозоидов (HL, HW, MP, PER) оценивали с помощью коэффициента линейной корреляции Пирсона (r), межвидовые различия этих показателей – с помощью канонического дискриминантного анализа. Для расчета доверительных интервалов (ДИ) коэффициента вариации (CV) морфометрических параметров использовали бустреп-доверительные интервалы, рассчитанные в пакете svsqv v. 1.0.0 с 999 повторениями [Beigy, 2019].

Вклад тестируемых факторов (вид, группа, особь) в общую изменчивость морфометрических показателей оценивали с помощью иерархических моделей дисперсионного анализа (Nested ANOVA), где статистической единицей была клетка. В этой модели фактор «особь» был вложен в фактор «группа», а фактор «группа» вложен в фактор «вид», все факторы считали случайными. Мы также оценили вклад фактора «популяция» во внутривидовую изменчивость для самой большой выборки рыжей полевки. Были изучены четыре популяции рыжей полевки из разных районов Среднего и Южного Урала (Пригородный, Нижнесергинский, Ревдинский, Миасский). Во второй модели иерархического анализа факторы «группа» и «особь» были вложены в фактор «популяция» (все факторы также были случайными).

Контроль над ожидаемой частотой ложных отклонений при множественных проверках статистических гипотез осуществляли с помощью поправки Беньямини–Йекутили (приведены скорректированные значения уровня значимости p).

Анализ *онтогенетической изменчивости* сперматозоидов выполнен в разделе 3.2. Для анализа изменчивости размеров нормальных сперматозоидов и встречаемости аномальных клеток использовали обобщенные линейные модели (GLM) для непрерывных и дихотомических признаков (линейная и логит-регрессия). Этот аппарат позволяет исследовать любой из факторов при учете эффекта остальных [Дрейпер, Смит, 2017].

Отношения шансов (OR) и их 95%-ные доверительные интервалы (ДИ) приведены после потенцирования коэффициентов логит-регрессии – логарифмов отношения шансов ($\exp(\ln OR)$ или $1/\exp(\ln OR)$). В качестве референтной группы выбраны половозрелые сеголетки. Контроль над ожидаемой частотой ложных отклонений при множественных проверках статистических гипотез осуществляли с помощью поправки Беньямини–Йекутили.

2.9.2 Анализ влияния химического загрязнения на морфологические показатели сперматозоидов

Анализ выполнен в разделе 3.2. Различия между *морфометрическими* показателями нормальных сперматозоидов половозрелых сеголеток и перезимовавших самцов оценивали с помощью t -критерия Стьюдента.

Связь между различными *аномалиями* сперматозоидов оценивали с помощью коэффициента ранговой корреляции Спирмена (R).

Поиск возможных предикторов развития патологий сперматозоидов (район, зона загрязнения, вид, группа) проводили с помощью обобщенных линейных моделей (GLM) для дихотомических признаков (множественная аддитивная логит-регрессия). Отношения шансов (OR) и их 95 %-ные ДИ приведены после потенцирования коэффициентов логит-регрессии – логарифмов отношения шансов ($\exp(\ln OR)$ или $1/\exp(\ln OR)$). В качестве референтной группы выбраны половозрелые сеголетки с фоновых участков в районе КМК.

2.9.3 Анализ подвижности и концентрации сперматозоидов

Анализ выполнен в главах 4 и 5. Для анализа показателей подвижности сперматозоидов использовали среднее арифметическое для особи, большинство показателей подвижности сперматозоидов имели нормальное распределение (тест Шапиро-Уилка). Структуру корреляций между показателями подвижности анализировали методом главных компонент (использовали вращение varimax rot). Поскольку исходные данные представляли собой несбалансированный комплекс (см. Таблицу 2.5), влияние факторов (район, зона загрязнения, группа) на подвижность и концентрацию сперматозоидов анализировали с помощью t -критерия Стьюдента и F -критерия Фишера для проверки равенства дисперсий. Для анализа доли объясненной дисперсии (R^2) использовали общие линейные модели (LM).

Для оценки межвидовых различий показателей подвижности и концентрации сперматозоидов использовали однофакторный дисперсионный анализ. Множественные сравнения выполнили с помощью критерия Тьюки.

2.9.4 Оценка влияния индивидуальной токсической нагрузки на сперматозоиды

Анализ выполнен в главе 6. Поскольку значения концентраций тяжелых металлов не были распределены нормально (тест Шапиро-Уилка), их предварительно логарифмировали (натуральный логарифм). Для оценки влияния факторов (район, зона загрязнения, вид, группа) использовали многофакторный дисперсионный анализ. Множественные сравнения между видами выполнили с помощью критерия Тьюки.

Связь между показателями морфологии, подвижности и концентрации сперматозоидов и индивидуальным уровнем накопления тяжелых металлов оценивали с помощью коэффициента линейной корреляции Пирсона (r).

2.9.5 Оценка влияния химического загрязнения на комплекс показателей сперматозоидов

Анализ выполнен в главе 7. Структуру связей между предикторами (район, зона загрязнения, концентрации тяжелых металлов, вид, группа) и зависимыми переменными (показатели сперматозоидов) оценивали для основной выборки грызунов с помощью анализа главных компонент. Значения показателей, измеряемых в мультипликативной шкале (доля аномальных и подвижных клеток, прямолинейность (STR)), предварительно преобразовывали в аддитивную шкалу – логарифм шансов (LO – Log Odds или логит – logit).

Вклад разных групп показателей сперматозоидов в межвидовые различия оценивали с помощью канонического дискриминантного анализа.

Глава 3. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ СПЕРМАТОЗОИДОВ

3.1 Естественная изменчивость

3.1.1 Меж- и внутривидовая изменчивость морфометрических показателей сперматозоидов

Морфология сперматозоидов млекопитающих – результат полового отбора, она отражает их основную функцию – доставку генома самца в яйцеклетку [Beatty, Sharma, 1961; Roldan et al., 1992; Sperm biology: an evolutionary perspective, 2009; Gómez Montoto et al., 2011b; Fitzpatrick, Lüpold, 2014; Lüpold, Pitnick, 2018; Pahl et al., 2018; Rossi et al., 2018]. Успешность транспорта генетической информации и последующего оплодотворения обеспечивают уникальные для каждого вида «биофизические ассоциации» между формой, размером и подвижностью клеток [García-Vázquez et al., 2016]. Видоспецифичность формы и размеров сперматозоидов широко используют для таксономической диагностики и филогенетических построений [Friend, 1936; Hirth, 1960; Cummins, Woodall, 1985; Gage, 1998]. Большое число таких работ выполнено на мышевидных грызунах [Аксенова, 1973, 1978; Lehmann, Schaefer, 1974; Баскевич, 1997; Breed, 2004, 2005; Баскевич и др., 2004a, 2004b; Rossi et al., 2018].

Для дифференциации видов грызунов, многие из которых имеют сложную форму головки сперматозоидов, используют как качественные показатели (наличие апикального крючка «apical hook» и зубовидного отростка «ventral spike»), так и количественные (размеры структурных элементов). Некоторые авторы дополнительно приводят различные морфометрические индексы, например отношение длины головки к ее ширине или к средней части хвоста и т. д. [Аксенова, 1973, 1978; Баскевич, 1997; Баскевич и др., 2004a; Gómez Montoto et al., 2011b; Tourmente et al., 2011; Zorenko, Golenishchev, 2015]. Таксономическую ценность морфологических показатели сперматозоидов обуславливает их незначительная, по сравнению с межвидовой, внутривидовая изменчивость (популяционная и индивидуальная) [Friend, 1936; Дмитриев и др., 1991].

Несущественная для систематики, внутривидовая изменчивость важна для исследования эволюционно-генетических и экологических аспектов морфологии сперматозоидов. Вариации структурно-функциональной организации мужских половых клеток широко изучают в связи с конкуренцией, инбридингом и гибридизацией [Ward, 1998; Breed, Taylor, 2000; Sperm biology: an evolutionary perspective, 2009; Tourmente et al., 2011; Simmons, Fitzpatrick, 2012; Šandera et al., 2013; Roldan, 2019; Skinner et al., 2019].

Влияние экологических факторов чаще исследуют применительно к крайним и поэтому хорошо различимым вариантам морфологической изменчивости сперматозоидов – патологиям. При этом принято считать, что размерные показатели нормальных сперматозоидов не зависят от экологических факторов [Beatty, Sharma, 1961; Beatty, 1970; Gage, 1998].

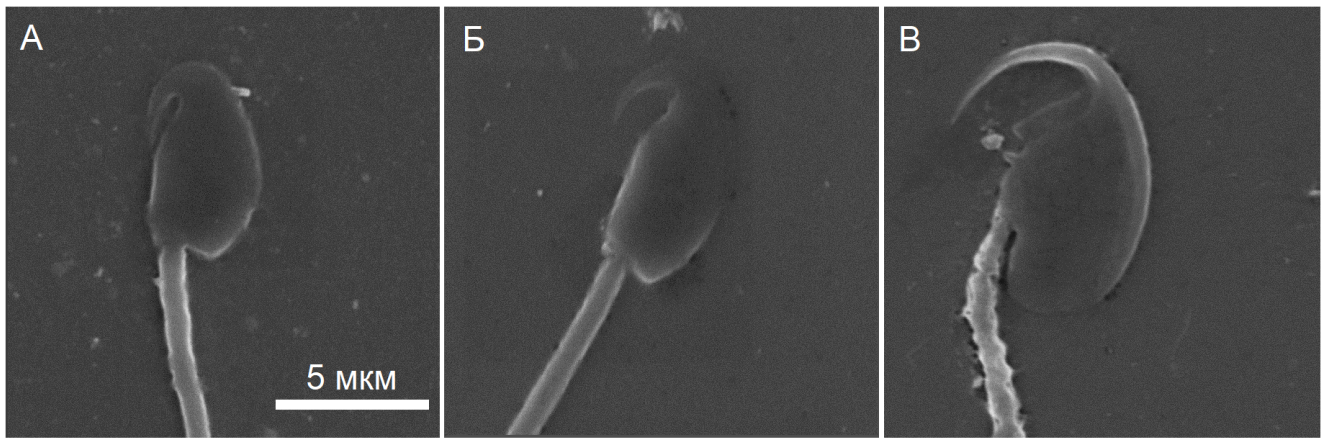
Несмотря на важность исследования внутривидовой изменчивости морфологических показателей сперматозоидов животных, сведения о ней недостаточны или отсутствуют для большинства грызунов, включая самые распространенные виды. Кроме того, поскольку разные компоненты изменчивости морфологии сперматозоидов исследуются разными научными направлениями, количественный анализ всех компонентов изменчивости почти никогда не является предметом самостоятельного исследования.

На примере широко распространенных видов мышевидных грызунов лесных экосистем Урала (*Clethrionomys glareolus*, *Clethrionomys rutilus*, *Lasiopodomys gregalis*, *Alexandromys oeconomus*, *Microtus agrestis*, *Sylvaemus uralensis*, *Apodemus agrarius*) и лабораторных мышей (СВА) мы оценили внутривидовую изменчивость размерных признаков сперматозоидов и ее вклад в межвидовую изменчивость [Smirnov et al., 2021].

Рассматривали два вида внутривидовой изменчивости:

- популяционную – между группами (половозрелыми сеголетками и перезимовавшими особями),
- индивидуальную – между особями.

Форма головки и размеры сперматозоидов. У исследуемых видов форма головки сперматозоидов неоднократно описана [Koehler, 1978; Баскевич, 1997; Breed, 2005]. Для них характерна секировидная (или серповидная/клювовидная, «falciform») головка из-за сильно выдающегося апикального крючка. Формы головки сперматозоидов полевков и малой лесной мыши хорошо различаются: у полевков апикальный крючок относительно короткий, зубовидный отросток отсутствует, место соединения головки и средней части расположено на базальном конце головки (Рисунок 3.1).



А – *Clethrionomys glareolus*, Б – *Clethrionomys rutilus*, В – *Sylvaemus uralensis*

Рисунок 3.1 – Форма головок сперматозоидов мышевидных грызунов (не модифицированные изображения, полученные с помощью SEM, Tescan VEGA II SBU)

У *S. uralensis* апикальный крючок сильно вытянут, зубовидный отросток хорошо выражен, место соединения головки и средней части хвоста расположено ближе к середине вентральной стороны. У *Cl. glareolus* головка сперматозоида имеет утолщение в базальной части головки, у *Cl. rutilus* она более вытянута (Рисунок 3.1).

Все размерные характеристики сперматозоидов у представителей сем. Muridae больше, чем у сем. Cricetidae, при этом максимальные размеры зарегистрированы у *S. uralensis*, минимальные – у *Cl. glareolus* (Таблица 3.1).

Таблица 3.1 – Морфометрические показатели (мкм) нормальных сперматозоидов грызунов

Показатель	Вид		
	<i>Cl. glareolus</i> , <i>n</i> = 129	<i>Cl. rutilus</i> , <i>n</i> = 20	<i>S. uralensis</i> , <i>n</i> = 26
HL	6.8 ± 0.01 6.4–7.2	7.7 ± 0.03 7.4–8.0	9.8 ± 0.03 9.5–10.1
HW	3.7 ± 0.01 3.5–4.0	3.7 ± 0.03 3.5–4.0	5.1 ± 0.02 4.9–5.3
MP	20.8 ± 0.03 20–21.6	23.5 ± 0.07 23.0–24.1	27.0 ± 0.09 26.1–27.5
PEP	55.4 ± 0.09 51.9–57.8	55.5 ± 0.20 54.0–57.4	90.4 ± 0.29 86.4–93.1
MP+PEP	76.2 ± 0.09 72.5 – 78.6	79.0 ± 0.22 77.4 – 81.4	117.3 ± 0.31 112.7 – 120.2
TSL	82.8 ± 0.11 80.9–84.6	86.6 ± 0.22 84.8–89.2	127.2 ± 0.30 122.5–130.1
HL/HW	1.83 ± 0.003 1.74 – 1.92	2.08 ± 0.013 1.90 – 2.16	1.91 ± 0.007 1.84 – 1.99
MP/HL	3.05 ± 0.007 2.85 – 3.29	3.06 ± 0.015 2.93 – 3.20	2.75 ± 0.011 2.66 – 2.87
PEP/MP	2.66 ± 0.005 2.52 – 2.79	2.36 ± 0.011 2.26 – 2.45	2.75 ± 0.011 2.66 – 2.87

Примечание – HL – длина головки; HW – ширина головки; MP – длина средней части хвоста; PEP – длина основной и концевой части; MP + PEP – общая длина хвоста; TSL – общая длина сперматозоида; HL/HW, отношение длины головки к ее ширине; MP/HL, отношение длины средней части к длине головки; PEP/MP, отношение длины основной части хвоста с концевой частью к длине средней части; над чертой приведено среднее \pm стандартная ошибка; под чертой – минимальное и максимальное значения; *n* – количество животных

К настоящему времени не только формы головок, но и размеры сперматозоидов описаны для многих видов млекопитающих. Например, J.M. Cummins и P.F. Woodall (1985) приводят данные для 284 видов; M.J.G. Gage (1998) – для 445; M. Tourmente с соавт. (2011) – для 226 и др. Имеющаяся литература позволила сравнить наши данные с данными других авторов [Friend,

1936; Cummins, Woodall, 1985; Дмитриев и др., 1991; Gage, 1998; Баскевич и др., 2004a; Breed, 2005; Tourmente et al., 2011]. При этом значения морфометрических признаков сперматозоидов у разных авторов несколько различаются: например, J.M. Cummins and P.F. Woodall (1985) указывают значение длины средней части хвоста сперматозоида для рыжей полевки – 19.5 мкм, С.Г. Дмитриев и соавт. (1991) – 22.0 ± 0.06 мкм. По нашим данным, значение этого признака соответствует 20.8 ± 0.03 мкм (Таблица 3.1). Эти небольшие различия, по-видимому, отражают разнообразие техник измерения.

Исследованные показатели сперматозоидов по-разному коррелируют друг с другом (Таблица 3.2)

Таблица 3.2 – Корреляции между морфометрическими показателями сперматозоидов грызунов

Вид	<i>n</i>	Показатель	HW	MP	PEP
<i>Cl. glareolus</i>	129	HL	0.72*	0.23*	0.05
		HW	–	0.15	0.08
		MP	–	–	0.14
<i>Cl. rutilus</i>	20	HL	0.68*	0.12	-0.14
		HW	–	0.08	0.07
		MP	–	–	0.09
<i>S. uralensis</i>	26	HL	0.49*	0.02	-0.16
		HW	–	0.15	-0.11
		MP	–	–	0.19

Примечание – HL – длина головки, HW – ширина головки, MP – длина средней части, PEP – длина основной части хвоста; * $p < 0.05$

У исследованных видов длина и ширина головки сперматозоида положительно связаны между собой. При этом размеры головки клеток не связаны с размерами хвоста. Исключение составляют *Cl. glareolus*, у которого длина головки сперматозоида положительно связана с длиной средней части хвоста (MP). С длиной всей клетки (TSL) длина головки (HL) сперматозоида положительно связана только у *Cl. glareolus* ($r = 0.26, p < 0.05$).

Вклад внутривидовой изменчивости морфометрических показателей в межвидовую изменчивость. Иерархический анализ, выполненный для восьми видов грызунов сем. Cricetidae и Muridae, показал, что в первой модели фактор «вид» вносил наибольший вклад в общую изменчивость по четырем показателям (HL, HW, MP и PER), при этом доля межвидовой изменчивости достигала максимальных значений (Таблица 3.3). Фактор «группа» не влиял на морфометрические показатели, но фактор «особь» был значимым. Вклад популяционной и индивидуальной вариации этих показателей в общую изменчивость был незначительным [Smirnov et al., 2021].

Во второй модели факторы «популяция» и «группа» не влияли на параметры теста, а вклад межпопуляционной и внутривидовой изменчивости в общую изменчивость вида (*Cl. glareolus*) отсутствовал (Таблица 3.3). Напротив, вклад индивидуальной изменчивости в эти параметры был значительным, его доля достигала высоких значений ($R^2 = 23.0\text{--}33.3\%$).

Как и ожидалось, фактор «вид» вносил наибольший вклад в вариации морфометрических показателей сперматозоидов грызунов. Межвидовые различия в морфологии сперматозоидов могут быть связаны с различными аспектами конкуренции сперматозоидов [Gage, 1998; Ward, 1998; Bauer, Breed, 2006; Gómez Montoto et al., 2011a, 2011b; Tourmente et al., 2011; Simmons, Fitzpatrick, 2012; Šandera et al., 2013; Varea-Sánchez et al., 2016; Roldan, 2019]. Некоторые авторы придерживаются идеи о том, что усиление конкуренции приводит к увеличению размеров сперматозоидов. Например, M.J.G. Gage (1998) предположил, что увеличение средней части позволяет ей упаковывать большее количество митохондрий и тем самым обеспечивает большее количество энергии для подвижности сперматозоидов. M. Tourmente с соавт. (2011) показали, что по мере усиления конкуренции сперматозоидов все структурные компоненты сперматозоидов комплексно увеличиваются в размерах, а головки сперматозоидов становятся более удлинёнными, при этом увеличение длины сперматозоидов обеспечивает повышенную скорость плавания – адаптивный признак в условиях конкуренции сперматозоидов.

Таблица 3.3 – Меж- и внутривидовая изменчивость морфометрических показателей сперматозоидов грызунов (результаты иерархического дисперсионного анализа)

Фактор	Показатель							
	HL		HW		MP		PEP	
	<i>F</i>	<i>R</i> ²	<i>F</i>	<i>R</i> ²	<i>F</i>	<i>R</i> ²	<i>F</i>	<i>R</i> ²
	Межвидовая изменчивость (без СВА)							
Вид	804.9*	93.3	232.2*	82.6	464.0*	93.4	2505*	99.0
Группа	1.0	0	1.7	0.2	2.6	0.3	2.1	0.1
Особь	10.4*	1.6	8.3*	3.4	9.0*	1.3	18.6*	0.3
	Внутривидовая изменчивость (только для <i>Cl. glareolus</i>)							
Популяция	0.4	0	0.3	0	1.0	0	1.3	0.6
Группа	2.1	2.6	1.4	0.9	0.3	0	1.2	0.5
Особь	13.0*	27.9	10.1*	23.0	10.9*	24.9	16.3*	33.3

Примечание – HL – длина головки, HW – ширина головки, MP – длина средней части, PEP – длина основной части хвоста сперматозоида; *F* – критерий Фишера; **p* < 0.01; *R*² – коэффициент детерминации (доля дисперсии)

На примере 11 видов грызунов L.G. Montoto с соавт. (2011b) показали, что кроме увеличения длины сперматозоида для скорости плавания имеет значение наличие апикального крючка. Используя инструменты геометрической морфометрии, M. Varea-Sánchez с соавт. (2016) оценили связь между формой акросомы и уровнем конкуренции между самцами грызунов. Авторы заключили, что на дизайн головки сперматозоида влияет посткопуляционный половой отбор, что в условиях конкуренции важно для увеличения скорости сперматозоидов. M. Šandera с соавт. (2013) у шести таксонов грызунов исследовали степень дисперсии длины акросомы и длины хвоста сперматозоидов. Авторы показали, что высокий уровень конкуренции сперматозоидов влияет на увеличение длины и

уменьшение дисперсии длины акросомы. Угол крючка акросомы и длина вентральных отростков также были связаны с уровнями конкуренции сперматозоидов между различными таксонами грызунов [Immler et al., 2007; McLennan et al., 2017; Pahl et al., 2018].

Вклад фактора «группа» в общую изменчивость размеров сперматозоидов у исследованных видов оказался незначительным (значение изменчивости, связанной с вариантом онтогенеза, подробно рассмотрено в следующем разделе). Наоборот, индивидуальные различия морфометрических показателей сперматозоидов были значимыми в обеих моделях. При этом вклад индивидуальной изменчивости в общую изменчивость оказался значимым только для второй модели, описывающей изменчивость показателей сперматозоидов у *Cl. glareolus*. Высокая доля необъясненной дисперсии во втором варианте анализа указывает на то, что существуют неисследованные факторы внутривидовой изменчивости (Таблица 3.3).

Коэффициенты вариации морфометрических показателей сперматозоидов грызунов. Самые высокие коэффициенты были зарегистрированы у полевок, самые низкие – у малой лесной мыши (Таблица 3.4). Ширина головки (HW) сперматозоида оказалась наиболее изменчивым показателем. Наши данные мы смогли сравнить только с данными для инбредных мышей [Williams et al., 1970]. Эти авторы также показали, что наибольший коэффициент вариации имеет ширина головки сперматозоида. Можно предположить, что этот показатель отражает качественные изменения (апоптоз или патологию) в ядре клетки.

При значительных различиях в коэффициенте вариации между разными морфометрическими признаками у одной особи коэффициенты вариации одного и того же признака у разных видов близки. Сходство коэффициентов вариации у разных видов может указывать на высокую степень консервативности размерных показателей сперматозоидов.

Таблица 3.4 – Коэффициенты вариации (CV, %) морфометрических показателей сперматозоидов грызунов (статистическая единица – особь)

Вид	n	Показатель				
		HL	HW	MP	PEP	TSL
<i>Cl. glareolus</i>	129	$\frac{2.4}{(2.1 - 2.7)}$	$\frac{2.8}{(2.5 - 3.2)}$	$\frac{1.5}{(1.4 - 1.7)}$	$\frac{1.8}{(1.5 - 2.0)}$	$\frac{1.3}{(1.1 - 1.5)}$
<i>Cl. rutilus</i>	20	$\frac{2.0}{(1.5 - 2.6)}$	$\frac{3.8}{(2.7 - 5.2)}$	$\frac{1.3}{(1.0 - 1.7)}$	$\frac{1.6}{(1.3 - 2.1)}$	$\frac{1.1}{(0.8 - 1.6)}$
<i>S. uralensis</i>	26	$\frac{1.5}{(1.1 - 1.9)}$	$\frac{1.9}{(1.5 - 2.4)}$	$\frac{1.4}{(1.1 - 1.7)}$	$\frac{1.6}{(1.1 - 2.3)}$	$\frac{1.2}{(0.8 - 1.7)}$

Примечание – HL – длина головки, HW – ширина головки, MP – длина средней части, PEP – длина основной части хвоста, TSL – общая длина сперматозоида; над чертой – CV, %, под чертой – 95 % ДИ

Межвидовая изменчивость морфометрических показателей сперматозоидов грызунов. Морфометрический анализ сперматозоидов позволяет дифференцировать виды грызунов, в том числе близкородственные [Давыдова и др., 2017а; Smirnov et al., 2021]. Дискриминантный анализ, выполненный для восьми видов грызунов, показал, что наиболее сильно показатели различаются между семействами Cricetidae и Muridae, минимальные различия обнаружены между родственными видами [Smirnov et al., 2021]. При сравнении трех видов (*Cl. glareolus*, *Cl. rutilus*, *S. uralensis*) с фоновых участков в районе СУМЗ получили сходный результат [Давыдова и др., 2017а]. Для дискриминации видов были значимы все исследуемые морфометрические показатели. В первую каноническую функцию основной вклад вносила длина основной части хвоста (PEP), во вторую – средняя часть хвоста сперматозоида (MP).

Таким образом, основной вклад в изменчивость размерных признаков сперматозоидов ожидаемо вносил вид. Доля популяционной изменчивости, связанной с принадлежностью к разным популяционным группам, оказалась

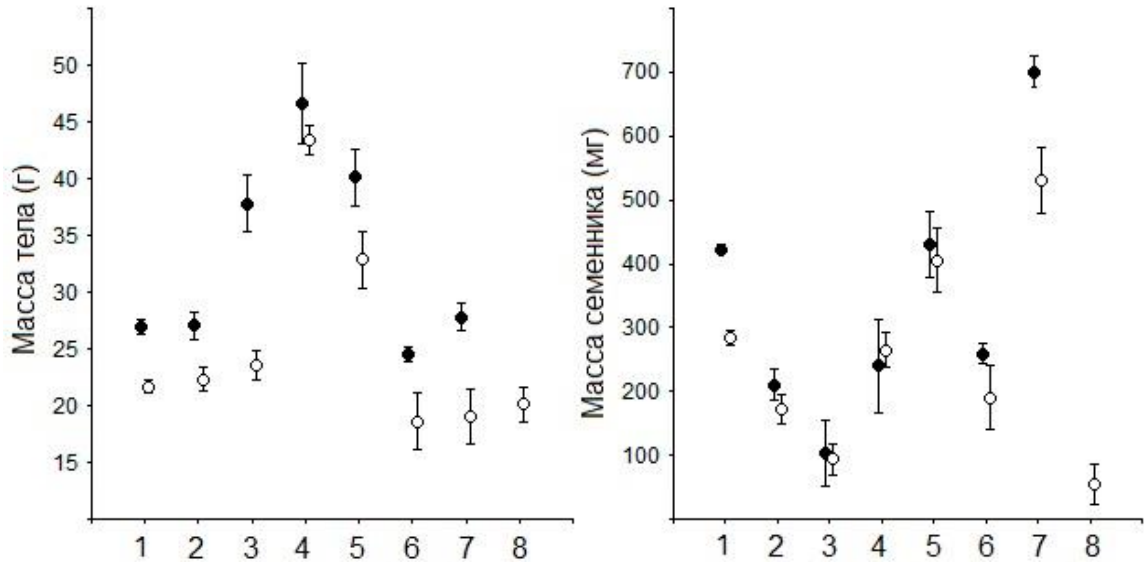
незначительной (в 5–10 раз меньше индивидуальной и в 15–20 раз меньше межвидовой изменчивости), поэтому в популяционных исследованиях репродукции самцов ею можно пренебречь. Вклад индивидуальной изменчивости размерных показателей сперматозоидов в общую изменчивость был существенным, поэтому ее необходимо учитывать при формировании выборок и анализе данных.

3.1.2 Онтогенетическая изменчивость морфологических показателей сперматозоидов

В предыдущем разделе различия морфологических показателей сперматозоидов между половозрелыми сеголетками и перезимовавшими особями рассматривали как один из видов внутривидовой изменчивости. Несмотря на то, что грызуны этих групп различаются по абсолютному возрасту, причина этих различий – онтогенетическая разнородность [Оленев, 1979, 1981, 1989, 2002, 2009; Оленев, Григоркина, 2016]. Она характерна для мышевидных грызунов природных зон умеренного пояса и, как уже упоминалось в разделе 2.4, определяется бивариантным развитием особей.

Реализация той или иной траектории развития зависит от времени рождения особи, состояния популяции и других факторов. Кроме продолжительности жизни (3–6 мес. у I варианта онтогенеза, 12–15 мес. – у II варианта), этот тип изменчивости детерминирует различия многих признаков: метаболических [Orekhova et al., 2019], биоэнергетических [Новиков и др., 2015], морфофизиологических [Оленев, 2002], системы крови [Тарахтий, Давыдова, 2007], возрастных изменений зубов [Оленев, 1989, 2009] и др. К репродуктивным признакам, различающимся у половозрелых сеголеток и перезимовавших особей можно отнести, например, массу и размер семенников и придаточных желез. Значения массы семенников у перезимовавших самцов многих видов существенно выше, чем у половозрелых сеголеток, и являются дефинитивными для вида (Рисунок 3.2) [Smirnov et al., 2021]. Сеголетки не успевают достигать этих значений из-за меньшей продолжительности жизни.

Регистрируемые различия позволяют называть эти группы функциональными, то есть выполняющими разную функцию в популяции: «моментальное» созревание для использования всех имеющихся ресурсов и повышения численности или «перетаскивание» популяции через неблагоприятный зимний период [Оленев, 1989, 2002, 2009; Смирнов, 2022].



1 – *Cl. glareolus*, 2 – *Cl. rutilus*, 3 – *L. gregalis*, 4 – *Al. oeconomus*, 5 – *M. agrestis*, 6 – *S. uralensis*, 7 – *A. agrarius*; белый маркер – половозрелые сеголетки, черный маркер – перезимовавшие особи

Рисунок 3.2 – Масса тела и масса семенников (среднее, ДИ)

у разных популяционных групп грызунов; $n = 4 - 129$; приведены средние значения для двух семенников из пары, цит. по [Smirnov et al., 2021]

Поскольку вариант онтогенеза обуславливает различия в скорости роста и созревания, продолжительности репродуктивного периода и плодовитости, его учитывают при анализе динамики популяции [Nyholm, Meurling, 1979; Bondrup-Nielsen, Ims, 1986; Löfgren, 1989; Klemme et al., 2014]. В целом, бивариантный онтогенез рассматривают как частный случай поливариантного онтогенеза, обеспечивающего перераспределение репродуктивных усилий в жизненном цикле особей [Новиков, Мошкин, 2009]. Результат этого перераспределения – функциональную неоднородность популяции – отражает репродуктивно-возрастная структура, в которой обычно различают неполовозрелых и половозрелых сеголеток и перезимовавших особей.

Существует несколько гипотез относительно того, с чем связаны физиологические особенности каждой из этих групп: среди них называют наличие зимней диапаузы, кумулятивное действие разных факторов среды и т.д. Однако до сих пор большинство авторов, за редким исключением (например, Новиков, Мошкин, 2009), описывают феноменологию различий, а не механизмы поливариантности развития.

Два аспекта онтогенетической изменчивости репродуктивных показателей. Кроме описанной выше изменчивости, обусловленной различными вариантами онтогенеза, у грызунов можно рассматривать также другой аспект онтогенетической изменчивости, который связан со стадиями полового развития животных (неполовозрелость, созревание, половозрелость, угасание половой функции) и не зависит от варианта онтогенеза. Самцов обеих популяционных групп, в свою очередь, по комплексу экстерьерных и интерьерных признаков и дате поимки можно дифференцировать на группы неполовозрелых, созревающих, половозрелых (потенциально способных к размножению) и с угасанием репродуктивной функции, сопровождающейся инволюцией семенника (в нашей работе эту группу самцов обозначали m/i). Оба аспекта изменчивости не конфликтуют между собой – всю совокупность онтогенетических (возрастных и репродуктивных) изменений можно исследовать, выделяя группы с учетом и варианта онтогенеза, и стадии полового развития.

Несмотря на то, что характеристики сперматозоидов животных важны для оценки мужской фертильности, у млекопитающих из природных популяций онтогенетическая изменчивость сперматозоидов изучена слабо. Большинство исследований выполнено на человеке [Sengupta, Nwagha, 2014; Johnson et al., 2015; Gunes et al., 2016], в меньшей степени – на лабораторных и сельскохозяйственных животных [Beatty, Mukherjee, 1963; Martí et al., 2011; Kipper et al., 2017], в редких случаях – на диких животных [Wolf et al., 2000; Martínez et al., 2008].

Чаще всего регистрируют ухудшение качества сперматозоидов, в том числе их морфологических характеристик, и снижение фертильности с возрастом

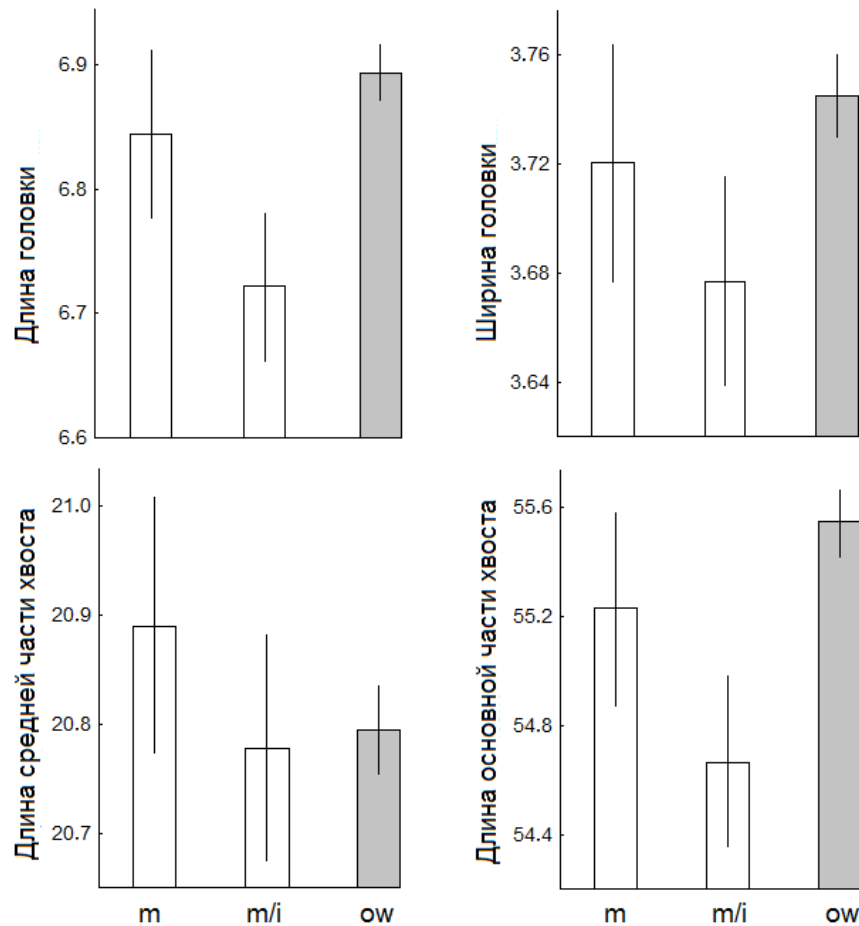
[Sengupta, Nwagha, 2014; Johnson et al., 2015]. В других работах не выявлено ухудшения репродуктивных характеристик при старении [Nieschlag et al., 1982; Rolf et al., 1999; Tang et al., 2012].

На примере *Cl. glareolus* мы выясняли, нужно ли учитывать онтогенетическую изменчивость при анализе размеров нормальных сперматозоидов и частоты встречаемости клеток с дефектами.

Мы не обнаружили различий морфометрических показателей нормальных сперматозоидов между тремя группами животных (m, m/i, ow): для длины головки $p = 0.17$, ширины головки $p = 0.72$, длины средней части хвоста $p = 0.99$, основной части хвоста $p = 0.17$ (Рисунок 3.3).

В другой выборке рыжей полевки ($n = 55$) из района СУМЗ морфометрические показатели сперматозоидов у двух групп (m, ow) также не различались: для длины головки $t = 0.4$, $p = 0.66$, ширины головки $t = 0.2$, $p = 0.87$, средней части хвоста $t = 0.2$, $p = 0.83$, основной части хвоста $t = 1.1$, $p = 0.27$ [Давыдова и др., 2017b]. И, наконец, аналогичный результат мы получили для других видов грызунов (см. первую часть раздела 3.1.2).

Отсутствие различий в размерах нормальных сперматозоидов у разных популяционных групп свидетельствует о консервативности половых клеток. При этом данные о непосредственно возрастной изменчивости морфометрических показателей сперматозоидов также крайне немногочисленны. Нам известны наблюдения R.A. Beatty и D.P. Mukherjee (1963), которые не обнаружили влияния абсолютного возраста на размерные признаки сперматозоидов линейных мышей (A/Be-CRe).



m – половозрелые сеголетки, m/i – сеголетки с инволюцией семенников, ow – перезимовавшие особи; разная заливка обозначает разные онтогенетические траектории:

белая – I вариант онтогенеза, серая – II вариант онтогенеза

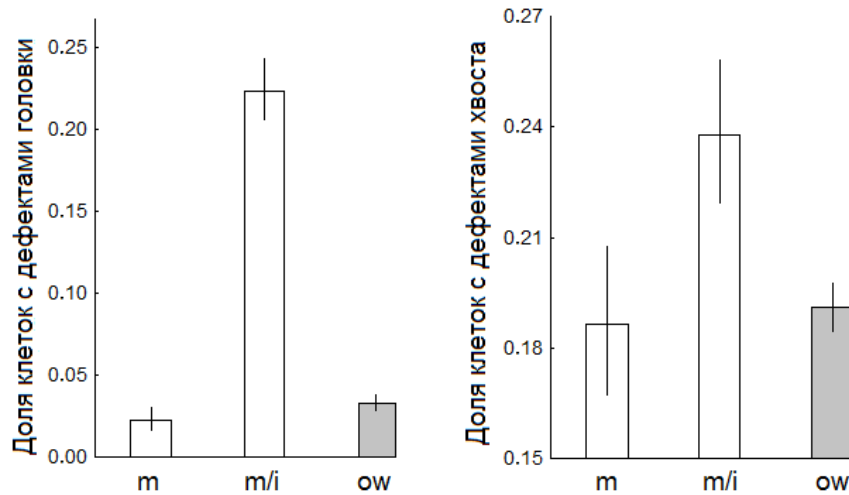
Рисунок 3.3 – Морфометрические показатели (мкм) сперматозоидов (среднее, ДИ) у *Cl. glareolus* разных популяционных групп

В то же время доля аномальных сперматозоидов различалась между тремя группами животных (m, m/i, ow): для дефектов головки $\chi^2(2) = 807.5$; $p < 0.0001$, для дефектов хвоста $\chi^2(2) = 22.8$; $p < 0.0001$. Минимальная частота встречаемости аномальных сперматозоидов обнаружена у половозрелых сеголеток (m) (Рисунок 3.4).

Доля клеток с дефектами головки у половозрелых сеголеток оказалась в 4.7 (95 % ДИ: 4.1–5.4) раза ниже по сравнению с сеголетками с инволюцией семенника ($\chi^2(1) = 446.4$; $p < 0.0001$) и в 1.7 (1.5–2.0) раза – с перезимовавшими особями ($\chi^2(1) = 59.4$; $p < 0.0001$). Доля сперматозоидов с дефектами хвоста у половозрелых сеголеток была ниже в 1.2 (1.1–1.3) раза, чем у сеголеток с

инволюцией семенника ($\chi^2(1) = 20.0$; $p < 0.0001$) и в 1.1 (1.0–1.2) раза, чем у перезимовавших особей ($\chi^2(1) = 6.2$; $p < 0.01$).

Высокая частота встречаемости дефектов головки сперматозоидов у сеголеток с инволюцией семенника, вероятно, связана со структурно-функциональными перестройками, сопровождающими сезонную/возрастную блокировку репродуктивной функции.



m – половозрелые сеголетки, m/i – сеголетки с инволюцией семенников, ow – перезимовавшие особи; разная заливка обозначает разные онтогенетические траектории:

белая – I вариант онтогенеза, серая – II вариант онтогенеза

Рисунок 3.4– Частота встречаемости аномальных сперматозоидов (среднее, ДИ) у *Cl. glareolus* разных популяционных групп

Можно предположить, что обнаруженные слабые различия частоты сперматозоидов с дефектами головки между половозрелыми сеголетками и перезимовавшими особями обусловлены разницей в абсолютном возрасте животных и «накоплением» поломок. В то же время, существенно большая частота встречаемости дефектов головки у сеголеток с инволюцией половых желез по сравнению с перезимовавшими особями свидетельствует о том, что эффекты блокировки репродуктивной функции намного сильнее эффектов, связанных с календарным возрастом животных.

Таким образом, для анализа морфологии нормальных сперматозоидов не существенно, на какой стадии зрелости/старения находятся животные и когда они

достигают половозрелости – в год своего рождения или после зимовки. Этот же вывод можно сделать и в отношении частоты встречаемости сперматозоидов с дефектами хвоста, поскольку обнаруженные эффекты, несмотря на статистическую значимость, оказались слабыми. При оценке частоты сперматозоидов с дефектами головки необходимо учитывать возможные инволютивные изменения, связанные с угасанием половой функции животных.

3.2 Влияние химического загрязнения

3.2.1 Морфометрические показатели сперматозоидов

Влияние загрязнения на морфометрические показатели нормальных сперматозоидов половозрелых самцов *Cl. glareolus* ($n = 55$) из района СУМЗ оказалось несущественным: для длины головки – $t = 1.3$, $p = 0.20$, ширины головки – $t = 0.3$, $p = 0.74$, средней части хвоста – $t = 0.2$, $p = 0.85$, основной части хвоста – $t = 0.8$, $p = 0.43$ [Давыдова и др., 2017b]. Этот результат ожидаем, и может быть объяснен консервативностью (видовой константностью) размерных показателей сперматозоидов, которая наряду с формой головки и многими другими механизмами распознавания самкой самца своего вида, обеспечивает успешное оплодотворение.

3.2.2 Встречаемость аномальных сперматозоидов

Среди нормальных эякулированных и эпидидимальных сперматозоидов могут присутствовать аномальные (дефектные) клетки. Различные дефекты структуры сперматозоидов свидетельствуют о снижении их оплодотворяющей способности [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2010], поэтому скрининг мужских гамет востребован в разных областях биологии и медицины [Wyrobek et al., 1983; Pesch, Bergmann, 2006]. У грызунов анализ дефектных сперматозоидов использовали для разных целей: изучения генетической изменчивости [Styrna et al., 2003; Осадчук, Осадчук, 2010; Осадчук, Клещёв, 2016], выявления связи с возрастом, гормональным и социальным статусом [Weissenberg et al., 1987; Bilińska et al., 2006; Kruczek et al., 2013], оценки

влияния различных факторов среды [Tannenbaum et al., 2007; Мамина, 2012; Kotula-Balak et al., 2014].

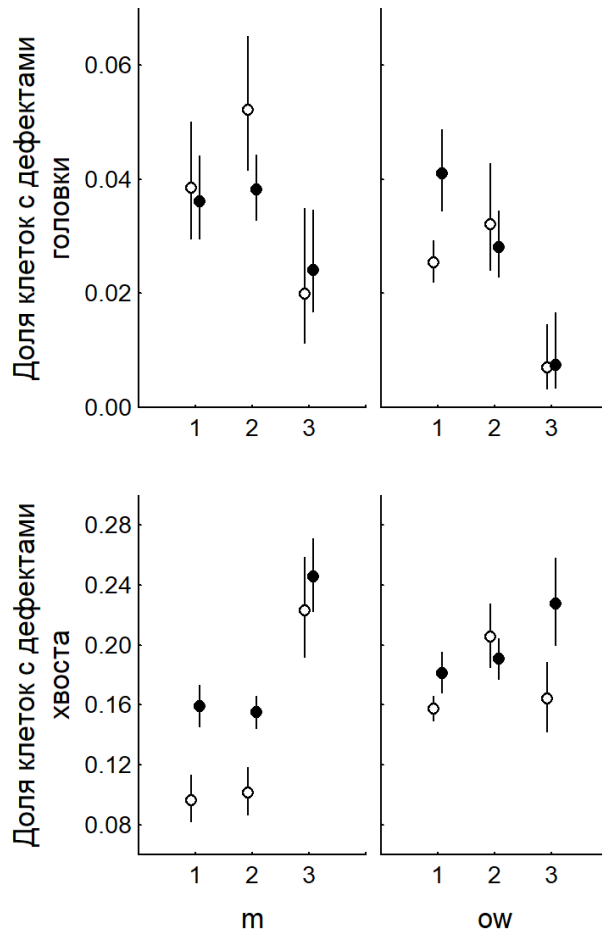
В многочисленных лабораторных экспериментах показано ухудшение качества сперматозоидов при затравке, включая и морфологические показатели [Wyrobek et al., 1983; Bucci, Meistrich, 1987; Wadi, Ahmad, 1999]. Однако известны и обратные примеры: при затравке долевой мыши алюминием не обнаружены различия в количестве аномальных сперматозоидов между контрольной и опытной группами [Llobet et al., 1995]. Результаты работ, выполненных на грызунах из природных популяций, также противоречивы: одни авторы зарегистрировали увеличение числа клеток с дефектами при токсическом воздействии [Miska-Schramm et al., 2014, 2017], другие таких изменений не обнаружили [Ieradi et al., 2003]. Еще раз подчеркнем, что для большинства видов «диких» грызунов отсутствуют сведения о естественной изменчивости доли аномальных сперматозоидов.

Влияние зоны загрязнения на частоту дефектных сперматозоидов модельных видов грызунов из основной выборки (Таблица 2.5) исследовали с учетом популяционной группы животных.

Фактор «вид» существенно влиял на встречаемость патологий головки и хвоста сперматозоидов: для дефектов головки $\chi^2(1)_{\text{Вальда}} = 21.6$, для дефектов хвоста $\chi^2(1)_{\text{Вальда}} = 56.2$ (при $p < 0.001$). Шансы обнаружить дефекты головки сперматозоидов у рыжей полевки были выше по сравнению с красной полевкой в 1.3 (95 % ДИ: 1.2–1.4) раза, по сравнению с малой лесной мышью – в 1.7 (1.3–2.0) раза. Шансы обнаружить дефекты хвоста клеток, наоборот, были ниже у рыжей полевки по сравнению с красной полевкой в 1.2 (95% ДИ: 1.1–1.2) раза, по сравнению с малой лесной мышью – в 1.4 (1.3–1.6) раза. Поскольку частота встречаемости патологий сперматозоидов у разных видов существенно различалась, влияние факторов (район, зона загрязнения, группа) рассматривали далее отдельно для каждого вида.

Все факторы по-разному влияли на частоту патологий сперматозоидов грызунов. Так, некоторые виды патологий чаще встречались у животных в районе

СУМЗ, например, дефекты головки и хвоста у красной полевки. Другие – в районе КМК, например, дефекты хвоста сперматозоидов у рыжей полевки (Таблица 3.5). На импактных участках доля всех патологий у *Cl. glareolus* и доля дефектов хвоста у *S. uralensis* была выше, чем на фоновых участках. У *Cl. rutilus* частота дефектов головки была выше на фоновых участках (Рисунок 3.5, Таблица 3.5).



1 – *Cl. glareolus*, 2 – *Cl. rutilus*, 3 – *S. uralensis*; белый маркер – фоновые участки, черный маркер – импактные участки; m – половозрелые сеголетки, ow – перезимовавшие особи

Рисунок 3.5 – Встречаемость аномальных сперматозоидов (среднее, ДИ) у грызунов с фоновых и импактных участков

Частота аномальных клеток в некоторых случаях различалась у грызунов разных популяционных групп. У молодых особей рыжей полевки встречаемость дефектов хвоста была ниже, чем у перезимовавших животных.

У *Cl. rutilus* дефекты головки чаще встречались у половозрелых сеголеток, а дефекты хвоста – у перезимовавших особей. У *S. uralensis* все виды патологий сперматозоидов чаще встречались у молодых животных.

У *Cl. glareolus* большинство обнаруженных эффектов оказались слабыми, т.е. вероятность обнаружения аномальных сперматозоидов в связи с тем или иным фактором не высок, т.е. отношение шансов близко к единице (Таблица 3.5).

Таблица 3.5 – Оценка влияния факторов на долю аномальных сперматозоидов грызунов (результаты логит-регрессии)

Фактор	Доля аномальных сперматозоидов					
	с дефектом головки			с дефектом хвоста		
	<i>b</i> (SE)	$\chi^2(1)$ Вальда	Отношения шансов [95% ДИ]	<i>b</i> (SE)	$\chi^2(1)$ Вальда	Отношения шансов [95% ДИ]
<i>Cl. glareolus</i>						
b_0	-3.52 (0.116)	918.8***	–	-1.99 (0.059)	1147.39***	–
Район	0.15 (0.105)	1.89	1.15 [0.94 – 1.42]	-0.11 (0.050)	5.32*	1.12 ⁻¹ [1.24 – 1.02] ⁻¹
Зона загрязнения	0.29 (0.104)	7.5**	1.33 [1.09 – 1.64]	0.29 (0.050)	32.9***	1.33 [1.21 – 1.47]
Группа	-0.15 (0.114)	1.75	1.16 ⁻¹ [1.46 – 1.07] ⁻¹	0.35 (0.058)	35.59***	1.42 [1.26 – 1.59]
<i>Cl. rutilus</i>						
b_0	-3.10 (0.111)	782.2***	–	-1.98 (0.063)	984.26***	–
Район	0.66 (0.128)	26.68***	1.94 [1.51 – 2.50]	0.29 (0.061)	22.70***	1.34 [1.19 – 1.51]
Зона загрязнения	-0.61 (0.134)	20.82***	1.84 ⁻¹ [2.40 – 1.42] ⁻¹	0.007 (0.070)	0.01	1.01 [0.88 – 1.16]
Группа	-0.313 (0.111)	8.03***	1.37 ⁻¹ [1.70 – 1.10] ⁻¹	0.43 (0.054)	35.59***	1.53 [1.38 – 1.70]
<i>S. uralensis</i>						
b_0	-3.66 (0.306)	143.7***	–	-1.49 (0.099)	228.63***	–
Район	-0.34 (0.281)	1.42	1.94 ⁻¹ [2.43 – 0.81] ⁻¹	0.23 (0.085)	7.42**	1.26 [1.07 – 1.49]
Зона загрязнения	0.17 (0.294)	0.32	1.18 [0.67 – 2.10]	0.25 (0.085)	8.93**	1.29 [1.09 – 1.52]
Группа	-1.20 (0.332)	13.1***	3.33 ⁻¹ [6.38 – 1.73] ⁻¹	-0.17 (0.085)	3.91*	1.18 ⁻¹ [1.40 – 1.00] ⁻¹

Примечание – b_0 – референтная группа: сеголетки, фоновые участки, район КМК, *b* – коэффициент регрессии, SE – стандартная ошибка, *p* – уровень значимости, ДИ – доверительные интервалы; **p* < 0.05, ***p* < 0.01, ****p* < 0.001

У красной полевки и малой лесной мыши некоторые эффекты, связанные с дефектами головки сперматозоидов, были сильнее. Например, шансы обнаружить аномалии головки были в 2–3 раза выше в зависимости от «района» или «группы». Но даже при максимальном значении шансов (у *S. uralensis* вероятность обнаружения патологий головок была в 3.3 раза больше у сеголетов, чем у перезимовавших особей) частота встречаемости патологий головки сперматозоидов у этого вида не превышала 3.5 % (Рисунок 3.5).

Дефекты головки и хвоста сперматозоидов оказались не связаны между собой: для рыжей полевки $R = 0.02$, $p = 0.88$, красной полевки $R = -0.27$, $p = 0.06$, малой лесной мыши $R = 0.07$, $p = 0.80$. Эти результаты согласуются с данными для других выборок: например, для рыжей полевки из района СУМЗ, в 2014 и 2016 гг., $R = 0.02$, $p = 0.88$, $n = 52$ [Смирнов, Давыдова, 2018]. Такие различия в частоте встречаемости и реакции на исследуемые факторы свидетельствуют в пользу мнения о различных причинах их возникновения [Pesch, Bergmann, 2006].

Полученные результаты по изменению частот аномалий согласуются с опубликованными нами ранее для других выборок грызунов с фоновых и импактных участков обоих районов [Смирнов, 2017, 2020; Смирнов, Давыдова, 2018, 2020]. Хотя направленность эффектов не всегда совпадала (для зоны загрязнения и популяционной группы), сила эффектов была на одном уровне – оценки шансов во всех случаях были близки к единице.

Спектр дефектов сперматозоидов. В основе всех классификаций патологий сперматозоидов лежит их приуроченность к определенным структурным элементам клетки. Считают, что причины возникновения дефектов различны: дефекты головки (ядра и акросомы), включающие изменение размера и формы, конденсацию или фрагментацию хроматина, вызваны атипичным спермиогенезом и апоптозом, а дефекты хвоста – геномными мутациями [Pesch, Bergmann, 2006].

Несмотря на единый «топографический» принцип, до сих пор нет унифицированной классификации патологий сперматозоидов. А.Ж. Wyrobek и W.R. Bruce (1983) выделяли шесть классов сперматозоидов с различными

дефектами головки и хвоста. Многие авторы рассматривали у грызунов только патологию головки, выделяя три [Осадчук, Осадчук, 2010], четыре [Kruczek et al., 2013] или пять [Styrna et al., 2003] типов дефектов. Степень детализации дефектов сперматозоида может быть очень высокой: например, для сирийских хомячков различали 17 типов дефектов хвоста и головки [Calvo et al., 1997]. Известен опыт применения для мелких грызунов классификации патологий сперматозоидов человека, рекомендованной ВОЗ [Кизилова и др., 2015]. Затруднения с распознаванием нормальных и дефектных сперматозоидов некоторые авторы преодолевали введением переходной категории – «квази-нормальных» клеток [BurrueI et al., 1996].

Мы рассматривали только две группы дефектов сперматозоидов (головки и хвоста), что позволило сравнить наши результаты с материалами других авторов, применявших разные классификации. Кроме того, огрубленный вариант классификации без детализации дефектов может быть использован для млекопитающих с менее сложной формой головки сперматозоида (например, мелких насекомоядных).

Классификация дефектов сперматозоидов связана с дискуссией о прогностической ценности морфологических признаков сперматозоидов для оценки потенциальной фертильности [Kishikawa et al., 1999]. Большинство авторов считают, что дефекты головки ведут к снижению оплодотворяющей способности и дефектам развития потомства [Chemes, Rawe, 2003; Menkveld, 2010; Киселева и др., 2017]. В то же время V.R. BurrueI с соавт. (1996) на основании данных о сохранности в дефектных сперматозоидах всех необходимых генов и ферментов заключили, что морфологические дефекты головки не следует считать признаком фатальной патологии мужских гамет. С другой стороны, Н. Kishikawa с соавт. (1999) у 15 % нормальных сперматозоидов мышей линии BALB обнаружили хромосомные аномалии. Определенный скепсис относительно прогностической ценности морфологических признаков сперматозоидов у репродуктологов нашел отражение в снижении референтного значения доли нормальных сперматозоидов [Menkveld, 2010].

Сравнение с опубликованными данными. Опубликованные данные о соотношении нормальных и дефектных сперматозоидов демонстрируют большой разброс значений у грызунов даже при отсутствии токсических воздействий. Например, J. Styrna с соавт. (2003) в норме у мышей линии СВА выявили около 14 % клеток с патологиями головок, Л.В. Осадчук с соавт. (2012) у мышей 13 инбредных линий – от 5 до 20 % [Осадчук и др., 2012].

Отмечена связь доли аномальных сперматозоидов с возрастом и физиологическим (гормональным) статусом [Weissenberg et al., 1987; Kruczek et al., 2013]. Так, у сирийских хомячков доля аномальных эпидидимальных сперматозоидов снижается почти в 3 раза при переходе от пубертатного периода к зрелости [Weissenberg et al., 1987]. У рыжей полевки в лабораторных условиях доля сперматозоидов с патологией головки варьировала от 3 до 16 %: наиболее высокие значения зарегистрированы у самых молодых (1.5 мес.) и самых старых (12 и 15 мес.) особей [Kruczek et al., 2013].

Разные авторы подчеркивали видоспецифичность спектра и частоты встречаемости дефектов сперматозоидов у грызунов. Так, Кизилова с соавт. (2015), использовавшие классификацию ВОЗ, среди 5 видов грызунов (*Myodes glareolus*, *Phodopus campbelli*, *Ph. sungorus*, *Apodemus agrarius*, *Acomys cahirinus*) самую низкую (менее 30 %) долю аномальных клеток обнаружили у иглистой мыши, джунгарского хомячка и полевой мыши, а самую высокую (более 80 %, причем большая часть аномалий была связана с дефектами акросомы и крючка головки) – у рыжей полевки. Другая группа исследователей, использовавшая собственную классификацию (различали аномалии головки, средней, основной и концевой части хвоста) патологий сперматозоидов, при сравнении 18 видов мышевидных грызунов также обнаружила видоспецифичность спектра и частоты встречаемости дефектов сперматозоидов [Gómez Montoto et al., 2011a]. Доля нормальных клеток у грызунов варьировала от 69.4 % до 93.4 %. Самое низкое значение доли нормальных сперматозоидов было у *M. duodecimcostatus* (69.4 %), самое высокое – у *Ap. sylvaticus* (93.4 %). У рыжей полевки доля нормальных

сперматозоидов составляла 90.1 % и была одной из самых высоких среди изученных видов.

В токсикологических работах также продемонстрировано большое варьирование доли аномальных сперматозоидов у грызунов. У мышей линии CF-1 доля аномальных сперматозоидов увеличивалась с 3.7 % в контроле до 9.7 % при заправке свинцом [Wadi, Ahmad, 1999], а у мышей линии swiss mice – от 9 % в контроле до 21 % при заправке алюминием [Llobet et al., 1995]. Доля сперматозоидов с петлеобразным хвостом (86 %) была в несколько раз больше доли клеток с дефектами головки (14 %) [Llobet et al., 1995], что сопоставимо с нашими результатами. Большие различия в частоте встречаемости двух типов дефектов можно расценивать как еще одно свидетельство их разной этиологии.

A. Miska-Schramm и соавт. (2014, 2017) в эксперименте с рыжей полевкой из лабораторной колонии показали, что доля патологий головки увеличивалась с «нормальных» 22 % в контроле до 43 % при заправке алюминием и до 54 % при заправке медью. В одной из работ, выполненных на грызунах из природных популяций, выявлена видоспецифичность изменения встречаемости аномальных сперматозоидов [Ieradi et al., 2003]: в контроле у желтогорлой мыши она была выше, чем у рыжей полевки, а существенные различия в доле аномальных сперматозоидов между фоновыми и загрязненными территориями были зарегистрированы только у желтогорлой мыши, но не у рыжей полевки.

Как мы уже упоминали (см. раздел 1.1), L.V. Tannenbaum и соавт., разработавшие метод оценки загрязненных участков по качеству эпидидимальных сперматозоидов грызунов, предложили обращать внимание не на статистические значимые отличия в показателях сперматозоидов грызунов между участками, а на пороговую отсечку для ухудшения показателей на 60 % (в 2.5 и более раз), если она не преодолена, то территория может считаться «чистой» [Tannenbaum et al., 2003, 2007; Tannenbaum, Beasley, 2016; Tannenbaum, 2020].

Подводя итог обсуждению, можно заключить, что в каудальной части эпидидимиса грызунов всегда можно обнаружить сперматозоиды с дефектами

хвоста, в то время как клетки с дефектами головки встречаются реже или могут отсутствовать.

Дефекты головки и хвоста не связаны между собой, а различающиеся частота встречаемости и реакция на исследуемые факторы свидетельствуют в пользу мнения о различных причинах их возникновения, а также видоспецифичности. В то же время обнаруженные эффекты, несмотря на статистическую значимость, оказались слабыми. В целом слабые различия частоты аномальных сперматозоидов в разных выборках могут свидетельствовать о естественном уровне изменчивости этого показателя.

Глава 4. ПОДВИЖНОСТЬ СПЕРМАТОЗОИДОВ

4.1 Референтные значения показателей подвижности сперматозоидов

Одним из наиболее информативных методов, определяющих функциональные свойства половых клеток, считают оценку их подвижности [Amann, Waberski, 2014]. Для лабораторных мышей (Swiss mice), например, установлены пороги «репродуктивного краха» – нижние уровни подвижности сперматозоидов, ведущие к резкому снижению фертильности самцов [Charin et al., 1997].

Подвижность сперматозоидов измеряют как «вручную», с помощью счетных (Бюркера, Нойбауэра, Горяева, Петрова-Хауссера и др.) или специализированных камер (Маклера, MMC-SR), так и с помощью различных полу- (CEROS, Hamilton Thorne, USA) или полностью автоматизированных систем (IVOS, Hamilton Thorne, USA), о которых мы упоминали в разделе 1.1.

Почти сразу после появления автоматических систем анализа сперматозоидов (середина 1980-х гг.) они были апробированы в токсикологических экспериментах и для выявления эффектов загрязнения среды [Amann, Katz, 2004]. Однако до сих пор большинство работ этой направленности выполнено на человеке [Nobles et al., 2018], хозяйственно значимых [Silva et al., 2019] и лабораторных животных [Adamkovicova et al., 2012]. Исследований животных из природных популяций значительно меньше [Gizejewski et al., 2008; Baberschke et al., 2021], а для условий загрязненной среды, за очень редким исключением [Tannenbaum et al., 2003, 2007], практически нет.

Несмотря на то, что в последние годы количество исследований с использованием CASA приближается к двум сотням (Рисунок 1.2), у многих видов животных показатели подвижности сперматозоидов не изучены, поскольку отбор эякулята зачастую затруднен. Как уже отмечалось в разделе 1.2, у мышевидных грызунов отбор усложняется из-за небольших размеров репродуктивных органов и объема эякулята, поэтому у них чаще исследуют

сперматозоиды из хвостовой части эпидидимиса как самые близкие по своим свойствам (жизнеспособности и фертильности) к сперматозоидам эякулята или клеткам из семявыносящего протока [Lakoski et al., 1988; Seed et al., 1996; Monteiro et al., 2011]. Полностью такие необходимые для естественного оплодотворения яйцеклетки свойства, как подвижность и капацитация, изначально иммобильные эпидидимальные сперматозоиды могут приобретать после добавления питательной среды, содержащей вещества, аналогичные семенной жидкости и веществам маточных путей [Monteiro et al., 2011; Li et al., 2015].

Видовые значения показателей подвижности сперматозоидов трех модельных видов грызунов приведены в Таблице 4.1. Несмотря на значительное количество работ по подвижности сперматозоидов, выполненных с помощью автоматических анализаторов [van der Horst et al., 2018; Yeste et al., 2018], для многих видов мелких млекопитающих сведения об этом показателе отсутствуют.

Мы могли сравнить наши данные только для рыжей полевки. Так, M. Kotula-Balak с соавт. (2014) приводят данные о подвижности сперматозоидов для 2-месячных самцов *Cl. glareolus* из лабораторной колонии, а M. Tourmente с соавт. (2015) – для *Cl. glareolus* ($n = 4$) из природной популяции.

Полученные нами средние значения показателей скорости движения сперматозоидов (VCL, VSL, VAP) для рыжей полевки отличаются от данных этих авторов (выше в 1.5–2 раза), показатель частоты колебаний головки (BCF) был сходным, а амплитуда отклонения головки (ALH) выше примерно в 2 раза. Наоборот, доля подвижных сперматозоидов у рыжей полевки была ниже по сравнению с данными других авторов. Так, в исследовании L. Gómez Montoto с соавт. (2011) она составляла 78.3 %, в исследовании M. Tourmente с соавт. (2015) – 81.3 %.

Причины таких различий могут быть разными – от особенностей выборок и условий содержания животных до методов отбора и анализа образцов сперматозоидов. К наиболее вероятным причинам, связанным с отбором и анализом образцов, относят глубину камер, состав питательной среды,

соблюдение температурного режима во время анализа, время предынкубации, опыт работы исследователя, разное программное обеспечение приборов [Yeste et al., 2018].

Таблица 4.1 – Показатели подвижности сперматозоидов грызунов (сеголетки и перезимовавшие) с фоновых территорий

Показатель	<i>Cl. glareolus</i> , <i>n</i> = 43	<i>Cl. rutilus</i> , <i>n</i> = 14	<i>S. uralensis</i> , <i>n</i> = 8
Motile, %	59.7 ± 1.35 ^Б (40.6 – 74.4)	53.4 ± 2.84 ^Б (36.0 – 70.9)	44.2 ± 5.91 ^{Б, В} (10.5 – 49.9)
VCL, мкм/с	251.2 ± 4.88 ^{А, Б} (183.2 – 345.5)	223.6 ± 6.23 ^А (185.1 – 267.7)	209.7 ± 11.35 ^Б (175 – 280.6)
VSL, мкм/с	198.5 ± 3.62 ^{А, Б} (145.2 – 245.6)	173.3 ± 6.82 ^{А, Б} (147.4 – 230.0)	123.4 ± 18.72 ^{Б, В} (48.5 – 233.8)
VAP, мкм/с	216.6 ± 3.89 ^{А, Б} (153.5 – 264.4)	188.7 ± 6.62 ^{А, Б} (156.9 – 244.2)	136.9 ± 17.43 ^{Б, В} (81.2 – 244.7)
ALH, мкм	9.12 ± 0.27 (6.88 – 12.96)	9.0 ± 0.53 (6.23 – 13.4)	8.9 ± 0.64 (7.2 – 13.1)
BCF, Гц	35.5 ± 0.48 ^{А, Б} (28.9 – 41.9)	38.9 ± 0.92 ^А (29.5 – 46.4)	38.7 ± 1.19 ^Б (31.9 – 42.5)
STR, %	91.1 ± 0.43 ^Б (83.3 – 96.3)	91.3 ± 0.93 (83.2 – 96.5)	86.6 ± 3.84 ^Б (60.3 – 94.6)
LIN, %	79.0 ± 0.69 ^Б (68.0 – 87.0)	78.1 ± 1.73 ^Б (65.9 – 86.2)	58.6 ± 5.9 ^{Б, В} (24.7 – 82.6)

Примечание – Motile – доля подвижных клеток, VCL – скорость криволинейного движения, VSL – скорость прямолинейного движения, VAP – скорость движения клетки по усредненному пути, ALH – амплитуда отклонения головки сперматозоида, BCF – частота колебаний головки сперматозоида, STR – степень направленности движения клетки, LIN – степень прямолинейности движения клетки; приведены среднее ± ошибка среднего, минимальные и максимальные значения показателей. Буквы указывают на различия (тест Тьюки, $p < 0.05$) между: А – *Cl. glareolus* и *Cl. rutilus*, Б – *Cl. glareolus* и *S. uralensis*, В – *Cl. rutilus* и *S. uralensis*

Иллюстрацией возможного влияния качества питательной среды на показатели подвижности сперматозоидов могут служить собственные данные, полученные при апробации методики и подборе питательной среды для небольшой выборки рыжей полевки (9 перезимовавших самцов, Сутукский участок, 2017 г.) [Смирнов, 2018]. Все скоростные показатели сперматозоидов были ниже по сравнению с приведенными в Таблице 4.1 (например, $VCL = 226.3 \pm 8.30$), поскольку в этом эксперименте использовали DMEM с низким содержанием глюкозы (≈ 1 г/л).

В то же время, влияние состава питательной среды на подвижность клеток не всегда очевидно. Так, сравнение разных питательных сред другими авторами показало, что добавление кальция, магния или глюкозы не улучшает показатели движения сперматозоидов в краткосрочной перспективе, напротив, альбумин необходим для длительного поддержания подвижности [Tayama et al., 2006]. В то же время цитируемые нами авторы [Kotula-Balak et al., 2014; Tourmente et al., 2015] использовали разные среды (IVF с глюкозой (≈ 1 г/л) и альбумином, и mT-H с глюкозой (6 г/л) без альбумина, но получили в целом сходные значения показателей подвижности для рыжей полевки.

Отдельного обсуждения требуют результаты, полученные нами для малой лесной мыши. Почти все показатели движения и доля подвижных сперматозоидов (за исключением ALH) у малой лесной мыши оказалась ниже, чем у полевок (см. Таблицу 4.1).

Поскольку данных о показателях подвижности сперматозоидов для этого вида найти не удалось, мы попытались сравнить их с имеющимися данными для родственного вида – европейской лесной мыши (*Apodemus sylvaticus* L. 1758) [Павлинов, 2006]. Сперматозоиды обоих видов имеют сходные форму головки и длину сперматозоида – 127.2 мкм у *S. uralensis* и 126.1 мкм у *Ap. sylvaticus* [Moore et al., 2002; Gómez Montoto et al., 2011a, 2011b; Smirnov et al., 2021].

Доля подвижных клеток у *Ap. sylvaticus* была выше, чем у *S. uralensis*, и варьировала от 82.5 % ($n = 8$) [Gómez Montoto et al., 2011a] до 87 % ($n = 5$) [Tourmente et al., 2015]. Однако, следует отметить, что этот показатель оценивали

визуально два независимых опытных наблюдателя (затем полученное значение усредняли), и сравнение аппаратных данных с субъективной оценкой может быть не вполне корректным. Скорость движения клеток (VAP) у *Ap. sylvaticus* составляла 115.4 мкм/с [Tourmente et al., 2015] и была сопоставимой с нашими данными для *S. uralensis*, но расчетное (по усредненным VSL и VCL) значение прямолинейности движения (LIN) было выше (87.1 %). В целом, противоречивые результаты сравнения двух представителей группы/секции *Apodemus* не могут служить объяснением обнаруженных различий в подвижности сперматозоидов между малой лесной мышью и полевками.

Можно предположить, что на показатели подвижности более крупных, по сравнению с полевками, сперматозоидов *S. uralensis* могла влиять глубина камеры [Peng et al., 2015; Soler et al., 2018]. Показано, например, что использование неглубоких (20 мкм) камер с капиллярным эффектом снижает скорость движения клеток [Gómez Montoto et al., 2011b; Tourmente et al., 2015]. Нельзя исключить и влияние питательной среды, на которую реакция клеток может быть видоспецифичной, что объяснило бы более низкие значения прямолинейности движения сперматозоидов (LIN) у малой лесной мыши по сравнению с полевками (см. Таблицу 4.1).

А. Valverde с соавт. (2019) на примере спермы хряков показали, что значения VSL и ALN устойчивы к настройкам съемки движения клеток [Valverde et al., 2019]. Этот важный результат позволяет ограничить список потенциальных факторов, влияющих на показатели подвижности сперматозоидов конкретного вида, двумя основными – особенностями методики отбора образцов и выборок. После стандартизации процедур отбора и анализа сперматозоидов показатели подвижности могут быть непосредственно интерпретированы как свойственные данной выборке (популяционной группе). Поскольку стандартизация отбора образцов спермы у мелких млекопитающих пока не достигнута, получение референтных значений для них возможно только в отдельно взятой лаборатории.

4.2 Межвидовые различия показателей подвижности сперматозоидов

Как было отмечено выше, на форму, размер и подвижность сперматозоидов влияет половой отбор [Lüpold, Pitnick, 2018; Pahl et al., 2018; Rossi et al., 2018]. Причиной эволюции размеров и формы сперматозоидов млекопитающих разные авторы считают меж- и внутривидовую конкуренцию [Ward, 1998; Gómez Montoto et al., 2011a, 2011b; Šandera et al., 2013]. Так, М. Tourmente с соавт. (2011) показали, что с возрастанием конкуренции увеличиваются все структурные элементы клетки, причем головки сперматозоидов становятся более вытянутыми. Эти авторы также обнаружили, что увеличение длины сперматозоидов связано с ростом скорости движения – адаптивной характеристикой при конкуренции.

4.2.1 Сравнение близкородственных видов полевок

Мы обнаружили, что при одинаковой доле подвижных клеток показатели скорости сперматозоидов у рыжей полевки были выше, чем у красной (Таблица 4.1). Однако некоторые морфометрические признаки сперматозоидов – длина головки, средней части хвоста и в целом всей клетки, наоборот, у красной полевки больше, чем у рыжей [Smirnov et al., 2021]. Форма головки сперматозоида у двух видов также несколько различается (Рисунок 3.1).

Известно также, что у рыжей полевки по сравнению с красной выше индекс семенника и уровень тестостерона в тестикулах, но ниже уровень этого гормона в крови [Громов, Осадчук, 2015]. Для физиологии размножения животных (в том числе грызунов) этот показатель чрезвычайно важен, так как может указывать на уровень производства половых гормонов и сперматозоидов и, как следствие, отражать степень меж- и внутривидовой конкуренции между самцами (т.е. чем выше индекс семенника, тем выше конкурентоспособность сперматозоидов вида или особи) [Gómez Montoto et al., 2011a; Амбарян и др., 2015; Tourmente et al., 2016; Lüpold et al., 2020]. Связь подвижности сперматозоидов с массой тела, семенников и придаточных желез у *Cl. glareolus* из лабораторной колонии обнаружили М. Kruzsek с соавт. (2013). Увеличение подвижности половых клеток авторы объясняли секреторной активностью придаточных половых желез,

которые находятся под непосредственным контролем андрогенов. В свою очередь, уровень андрогенов (в том числе тестостерона) связан с ростом и развитием половых органов. Однако в больших количествах тестостерон может подавлять выработку сперматозоидов, а также секрецию гормонов гипофиза (ФСГ и ЛГ), участвующих в контроле стероидогенеза [Matsumoto et al., 1986].

На первый взгляд, конкурентное преимущество должны иметь самцы с более крупными половыми органами и сперматозоидами, однако, по-видимому, успешность репродукции вида обусловлена более сложными взаимодействиями (структурными и биохимическими) элементов репродуктивной системы, а не только их размерами. Необходимо еще раз подчеркнуть, что различия формы, размеров и подвижности сперматозоидов рыжей и красной полевок не препятствуют их гибридизации в лаборатории (Осипова, Соктин, 2006, 2008) и природе [Абрамсон и др., 2009; Бородин и др., 2011].

4.2.2 Сравнение полевок и малой лесной мыши

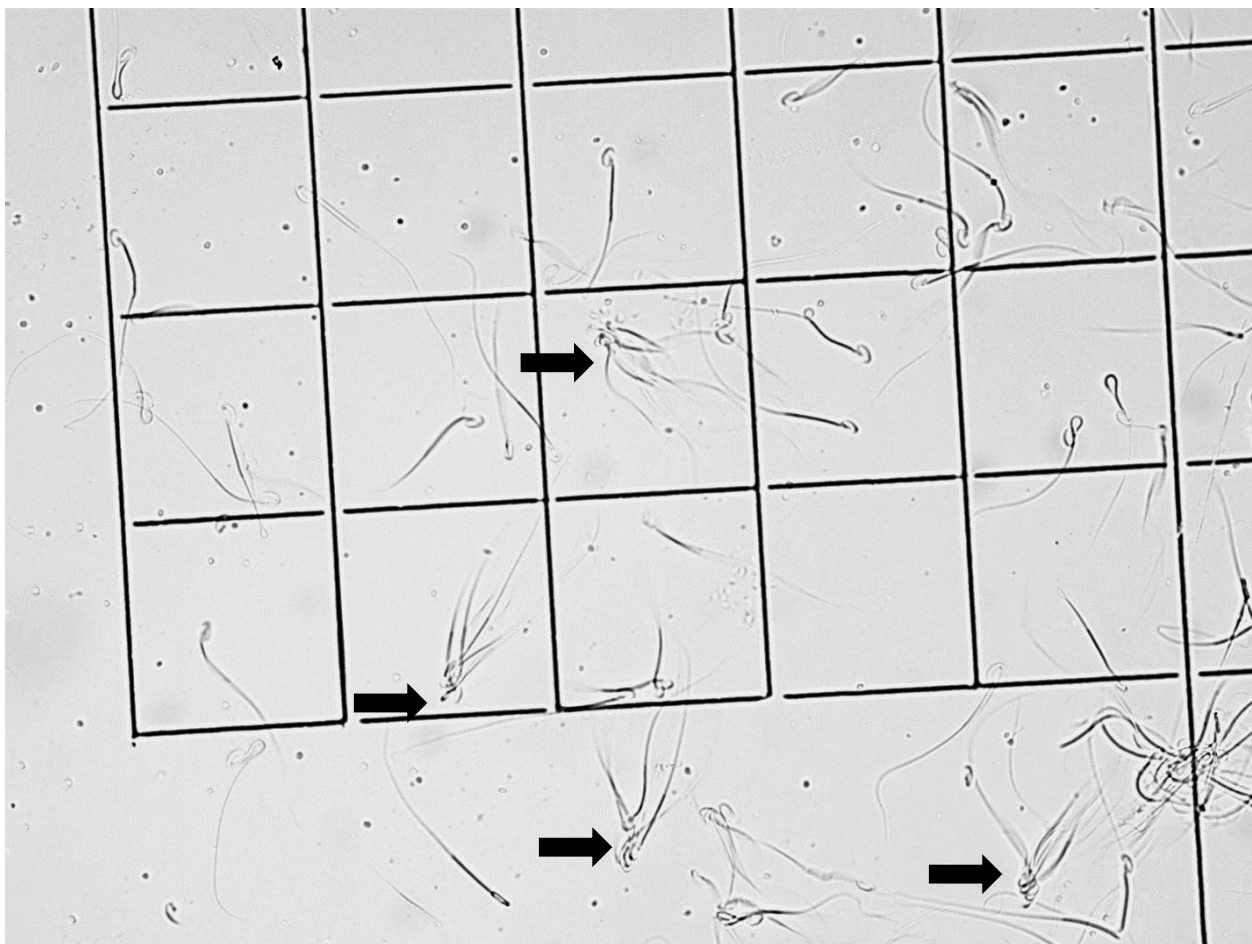
Как уже упоминалось, большинство показателей подвижности сперматозоидов малой лесной мыши существенно ниже, чем у полевок. Если исключить возможные технические причины этого результата (недостаточная глубина камеры для анализа образцов, неподходящая питательная среда и др.), то причиной низкой подвижности сперматозоидов может быть образование так называемых «поездов» сперматозоидов (sperm-train) – характерных для некоторых представителей группы/секции *Apodemus* (включая *Sylvaemus*). Образование «поездов» – скоплений клеток, в которых сперматозоиды прикрепляются друг к другу головной областью (в основном за счет области крючка) и образуют подвижные агрегаты из 10–50 клеток – впервые описано для *Ap. sylvaticus* [Moore et al., 2002]. Позже такие «поезда» обнаружили у других видов рода *Apodemus* (*Ap. flavicolis*, *Ap. microps*, *Ap. agrarius*) [Dvorakova, Stopka, 2004], а также у представителей других семейств, например, сем. Cricetidae (р. *Peromyscus*) [Fisher, Hoekstra, 2010].

Вопрос об образовании «поездов» до сих пор дискуссионен. Некоторые исследователи считают, что при скоплении сперматозоиды достигают более

высокой скорости плавания, чем сперматозоиды, плавающие по отдельности. Так, у *Ap. sylvaticus* скорость одиночных сперматозоидов была ниже, чем у «поездов» (87 мкм/с против 132 мкм/с, соответственно) [Moore et al., 2002]. Наоборот, у других видов (например, *M. musculus*) отдельные сперматозоиды двигались быстрее [Immler et al., 2007]. При сравнении двух видов рода *Peromyscus* обнаружили, что самцы вида *P. maniculatus* с более высоким уровнем конкуренции, чем *P. polionotus*, легче распознают сперматозоиды друг друга и чаще образуют агрегаты [Fisher, Hoekstra, 2010]. Кроме того, такие виды (показано на примере *P. maniculatus*) чаще образуют агрегаты по 6–7 клеток с оптимальными характеристиками движения – без потери скорости, но с более высокими показателями прямолинейности [Fisher et al., 2014]. Однако если сперматозоидов в агрегате слишком много, то все показатели подвижности ухудшаются.

Несмотря на то, что сперматозоиды многих грызунов имеют апикальный крючок [Breed, 2005], это не служит достаточным условием для образования «поездов» [Tourmente et al., 2016]. При сравнении 25 видов грызунов показано, что у всех видов, независимо от наличия апикального крючка и уровня конкуренции, доля одиночных сперматозоидов среди подвижных клеток составляла в среднем 92–99 % (у рыжей полевки 99.83 %), за исключением *Ap. sylvaticus*, у которого на долю одиночных сперматозоидов приходилось только 48.77 % [Tourmente et al., 2016].

Мы также наблюдали в некоторых образцах прогрессивно подвижные агрегаты из 6–10 клеток (Рисунок 4.1). Их небольшое количество, возможно, связано с рассеиванием сперматозоидов из агрегатов в течение какого-то времени. Показано, что у *Ap. sylvaticus* рассеивание агрегатов *in vitro* начинается примерно через 30 минут [Moore et al., 2002], у двух видов *Peromyscus* – через 40 минут [Fisher, Hoekstra, 2010]. Мы не определяли время рассеивания агрегатов для *S. uralensis* и не учитывали их в анализе.



Стрелки указывают на «поезда» сперматозоидов (sperm-train)

Рисунок 4.1 – Агрегаты сперматозоидов («поездов») у *S. uralensis*
(перезимовавший самец, импактный участок в районе СУМЗ, 2020 г.),
увеличение x200, без окрашивания

Таким образом, до сих пор образование агрегатов сперматозоидов у некоторых видов мышевидных грызунов считают биологической «странностью» [Tourmente et al., 2016]. Одна из первых гипотез относительно функциональности такой формы акросомы сперматозоидов заключалась в том, что она может действовать как крючок, цепляясь за эпителий женских половых путей, что улучшает транспорт сперматозоидов по половым путям самки и прикрепление сперматозоидов к перешейку яйцевода (*isthmus tuba uterina*), образуя резервуар сперматозоидов [Suarez, 1987; Smith, Yanagimachi, 1990]. Позже R.C. Firman и L.W. Simmons (2009) предположили, что прикрепление сперматозоидов к женским путям приводит к предотвращению пассивной потери сперматозоидов и снижению расхода энергии сперматозоидов [Firman, Simmons, 2009].

Еще одна гипотеза состоит в том, что форма терминального конца крючка, наряду с особым характером движения жгутиков во время взаимодействия сперматозоида и яйцеклетки, может увеличивать физическое давление, оказываемое на оболочки яйцеклетки, и облегчать проникновение сперматозоидов [Flaherty et al., 1983; Drobniš et al., 1988]. Однако ни одна из гипотез пока не подтверждена.

Считают, что виды грызунов с высоким уровнем конкуренции сперматозоидов производят более быстрые сперматозоиды, и что скорость сперматозоидов положительно коррелирует с площадью головки сперматозоида и длиной хвоста [Gómez Montoto et al., 2011b]. Примечательно, что площадь головки сперматозоида имеет более высокие значения у видов, у которых присутствует апикальный крючок. Появление крючка связывают с увеличением длины сперматозоидов у грызунов [Roldan et al., 1992; Breed, 2004, 2005]. Поскольку сперматозоиды мышевидных грызунов имеют тенденцию увеличиваться в длину при высоком уровне конкуренции сперматозоидов, а более длинные сперматозоиды, как правило, плавают быстрее [Tourmente et al., 2011], появление крючка и удлинение хвоста могут быть частью интегральной морфологической адаптации к высокой конкуренции [Tourmente et al., 2016].

Полученные нами данные демонстрируют, что уровни конкуренции между самцами разных видов, определенные по индексу конкурентности (относительной массе семенников) (Таблица 2.3) [Kenagy, Trombulak, 1986], соответствует уровням, определяемым по скоростным показателям подвижности сперматозоидов: *Cl. glareolus* > *Cl. rutilus* > *S. uralensis* (Таблица 4.1), но полностью противоречат уровням, определяемым по размерным признакам половых клеток: *S. uralensis* > *Cl. rutilus* > *Cl. glareolus* (Таблица 3.1). Можно предположить, что размер сперматозоидов не единственный фактор, влияющий на конкурентоспособность самцов, и не исключено существование других репродуктивных стратегий, помимо увеличения длины клетки (площади головки), например, образования поездов (sperm-train).

4.3 Выбор ключевых показателей подвижности сперматозоидов

Из-за видоспецифичности показателей подвижности сперматозоидов (Таблица 4.1) далее их анализировали отдельно для каждого вида.

У *Cl. glareolus* на первые две главные компоненты (PC 1 и PC 2) изменчивости показателей подвижности сперматозоидов приходилось 84.2 % общей дисперсии, у *Cl. rutilus* – 84.4 %, у *S. uralensis* – 92.1 % (Таблица 4.2). В первую главную компоненту у всех трех видов основной вклад вносили показатели, характеризующие скорость сперматозоидов, во вторую – направленность движения. Для дальнейшего анализа выбрали два хорошо интерпретируемых показателя с высокими факторными нагрузками, не коррелирующие между собой – VCL (PC 1) и STR (PC 2). Также анализировали долю подвижных клеток (Motile).

Таблица 4.2 – Факторные нагрузки двух главных компонент (PC 1 и PC 2) по показателям подвижности сперматозоидов *Cl. glareolus*, *Cl. rutilus*, *S. uralensis*

Показатель	<i>Cl. glareolus</i>		<i>Cl. rutilus</i>		<i>S. uralensis</i>	
	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2	PC 1	PC 2
VCL, мкм/с	0.91	0.35	0.91	-0.26	0.97	-0.05
VSL, мкм/с	0.98	-0.19	0.96	0.24	0.87	0.49
VAP, мкм/с	0.99	0.10	0.99	0.02	0.90	0.42
ALH, мкм	0.35	0.92	0.23	-0.92	-0.04	-0.98
BCF, Гц	-0.28	-0.27	-0.44	0.33	-0.74	-0.35
STR, %	0.00	-0.97	0.05	0.97	0.38	0.88
LIN, %	0.12	-0.94	0.52	0.79	0.65	0.75
Доля общей дисперсии, %	42.6	41.6	46.6	37.8	51.6	40.5

Высокий уровень корреляции показателей скорости движения (VCL, VSL, VAP) сперматозоидов, обнаруженный нами у трех видов грызунов (Таблица 4.2), показали также L. Gómez Montoto с соавт. (2011b) для 11 видов грызунов,

М. Tourmente с соавт. (2015) для 18 видов, включая *Cl. glareolus*. Сходство связей показателей, приводимое этими авторами, может быть косвенным свидетельством валидности проведенного нами анализа. Кроме того, высокая степень корреляции показателей VCL, VSL, VAP может быть еще одним свидетельством прямолинейности их движения наряду с рассчитываемыми показателями STR и LIN.

4.4 Подвижность сперматозоидов в разных популяционных группах

Связь подвижности сперматозоидов с абсолютным возрастом, как и многие другие аспекты анализа качества спермы, чаще изучают у человека [Johnson et al., 2015], хозяйственно значимых [Ntemka et al., 2019], лабораторных [Syntin, Robaire, 2001] и диких животных в эксперименте [Wolf et al., 2000; Kruczek et al., 2013]. Для животных из природных популяций таких работ значительно меньше, однако известны примеры возрастной изменчивости показателей подвижности сперматозоидов у южноафриканского гепарда (*Acinonyx jubatus*) [Crosier et al., 2007] и испанского благородного оленя (*Cervus elaphus hispanicus*) [Martínez et al., 2008]. У некоторых видов долгоживущих животных (сельскохозяйственных и диких) изучали сезонную компоненту возрастных изменений подвижности сперматозоидов [Kozdrowski, Dubiel, 2004; Ntemka et al., 2019].

Влияние абсолютного возраста на долю прогрессивно подвижных сперматозоидов *Cl. glareolus* из лабораторной колонии обнаружили М. Kruczek с соавт. (2013): самая высокая доля этого класса клеток была у 4-месячных самцов по сравнению с более молодыми и более старыми. Авторы также показали, что с 6-месячного возраста до конца репродуктивного периода (возраст 15 мес.) качество сперматозоидов (включая показатели подвижности) полевых значительно снижалось. Работы по изучению влияния варианта онтогенеза на подвижность сперматозоидов грызунов нам не известны.

Мы обнаружили, что принадлежность к той или иной группе не влияла на показатели подвижности сперматозоидов грызунов: для *Cl. glareolus* $|t| = 0.82$ –

1.65, $p = 0.103 - 0.417$; для *Cl. rutilus* $|t| = 0.47 - 1.30$, $p = 0.200 - 0.637$; для *S. uralensis* $|t| = 0.13 - 1.70$, $p = 0.108 - 0.900$.

В разделе 3.1 мы показали на примере *Cl. glareolus*, что для анализа морфологии нормальных сперматозоидов не важно, на какой стадии зрелости/старения находятся животные и когда они достигают половозрелости. По-видимому, показатели подвижности, как и морфологические показатели нормальных сперматозоидов, следует считать дефинитивными характеристиками половозрелых особей, которые не зависят от популяционной группы.

Однако нам пока не удалось исследовать онтогенетическую изменчивость показателей подвижности, связанную со стадиями полового развития (созреванием, половозрелостью, угасанием половой функции).

4.5 Влияние химического загрязнения

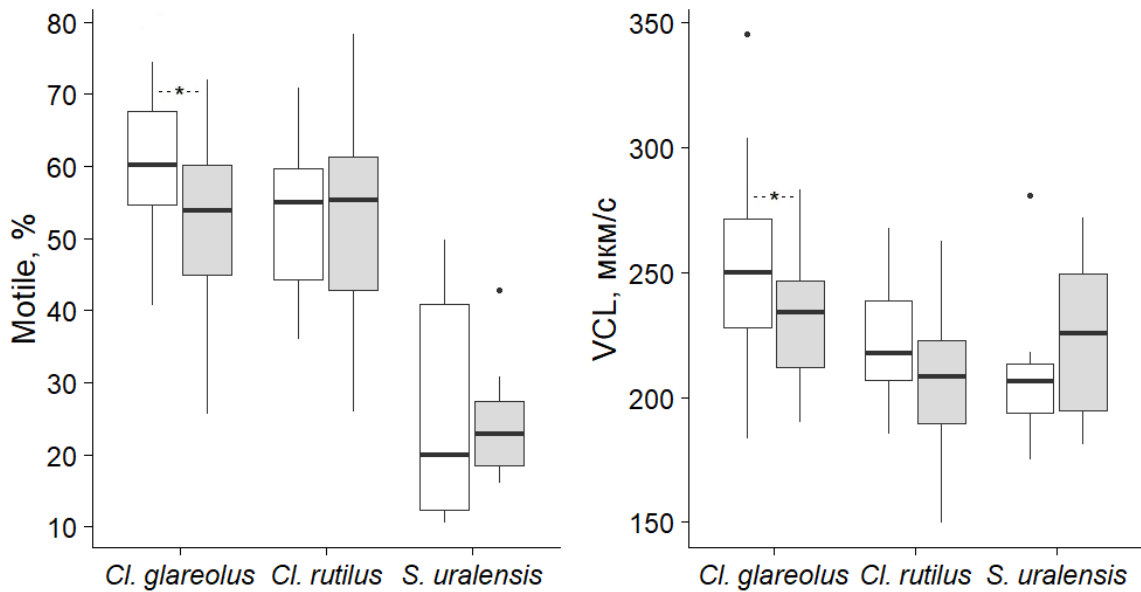
Фактор «район» также не влиял на показатели подвижности сперматозоидов грызунов: для *Cl. glareolus* $|t| = 0.31 - 1.27$, $p = 0.209 - 0.756$; для *Cl. rutilus* $|t| = 0.32 - 0.56$, $p = 0.575 - 0.752$; для *S. uralensis* $|t| = 0.61 - 1.58$, $p = 0.133 - 0.548$. Поскольку влияние популяционной группы и района отловов оказалось не существенным, для дальнейшего анализа мы объединили животных разных групп и из разных районов.

Влияние зоны загрязнения на Motile и VCL у рыжей полевки оказалось значимым: на импактных участках доля подвижных клеток и их скорость оказались ниже, чем на фоновых ($t_{\text{Motile}} = -2.60$, $p = 0.011$; $t_{\text{VCL}} = -2.43$, $p = 0.018$) (Рисунок 4.2). Однако фактор «зона загрязнения» объяснял только 9 % общей дисперсии для Motile и 8 % – для VCL. У красной полевки и малой лесной мыши оба показателя не различались между зонами: для *Cl. rutilus* $t_{\text{Motile}} = -0.21$, $p = 0.837$; $t_{\text{VCL}} = -1.87$, $p = 0.067$); для *S. uralensis* $t_{\text{Motile}} = -0.29$, $p = 0.772$; $t_{\text{VCL}} = 0.92$, $p = 0.373$.

Показатель направленности движения (STR) сперматозоидов у всех видов не различался между зонами: для *Cl. glareolus* $t = 0.60$, $p = 0.548$; для *Cl. rutilus* $t = -0.76$, $p = 0.451$; для *S. uralensis* $t = 1.21$, $p = 0.242$.

Также у рыжей полевки на импактных участках была выше изменчивость показателя Motile ($CV_{Bg} = 14.85$; $CV_{Im} = 25.18$; $F_{Motile} = 2.26$, $p = 0.017$) – только здесь встречались особи с крайне низкими показателями подвижности сперматозоидов (Рисунок 4.2).

У малой лесной мыши, наоборот, изменчивость показателя Motile оказалась выше у животных на фоновых участках: $CV_{Bg} = 63.81$; $CV_{Im} = 32.81$, $F_{Motile} = 4.34$, $p = 0.045$.



фоновые участки – без заливки, импактные участки – серая заливка; горизонтальная черта – медиана, границы ящика – межквартильный размах, усы – минимальное и максимальное значения, не превышающие 1.5 межквартильных размаха, точка – выброс;

* – различия при $p < 0.05$

Рисунок 4.2 – Доля подвижных сперматозоидов (Motile, %) и скорость движения сперматозоидов по кривой (VCL, мкм/с) у грызунов с фоновых и импактных участков

В токсикологических экспериментах, как правило, отмечают дозовую зависимость между уровнями токсикантов и показателями подвижности. Так, у опытной группы *Cl. glareolus* из лабораторной колонии при затравке сульфатом меди и хлоридом алюминия обнаружено снижение доли подвижных сперматозоидов по сравнению с контрольными животными (с 82 до 6 %) [Miska-Schramm et al., 2014, 2017]. При этом снижение подвижности сперматозоидов

сопровождалось увеличением доли клеток с аномальной головкой. Авторы предположили, что, например, медь при высоких концентрациях могла вызывать окислительный стресс, повреждающий сперматозоиды и, как следствие, снижающий их подвижность и оплодотворяющую способность.

L.V. Tannenbaum с соавт. (2003, 2007) исследовали сперматозоиды разных видов грызунов, обитающих на участках, в почве которых содержатся высокие уровни тяжелых металлов, тротила, гексогена и других опасных веществ. Однако, несмотря на статистические различия показателей сперматозоидов грызунов с фоновых и загрязненных участков, эти различия не превышали пороговых (40–50 % – для показателей подвижности клеток, 60 % – для количества клеток) для признания территории опасной.

Таким образом, показатели подвижности сперматозоидов оказались видоспецифичными: большинство из них у малой лесной мыши существенно ниже, чем у полевок. Различия могут быть связаны как с техническими причинами, так и с уровнем межвидовой конкуренции. Показатели подвижности сперматозоидов не зависели от района и популяционной группы. У *Cl. rutilus* и *S. uralensis* показатели подвижности (Motile, VCL, STR) не различались между участками с разным уровнем загрязнения. У *Cl. glareolus* на сильно загрязненных участках доля подвижных клеток (Motile) и скорость сперматозоидов (VCL) были снижены по сравнению с фоновыми. Однако изменчивость показателей, обусловленная загрязнением, составляла всего 9 и 8 %, соответственно, т.е. показатели подвижности сперматозоидов грызунов из природных популяций слабо подвержены влиянию загрязнения.

Глава 5. КОНЦЕНТРАЦИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ

5.1 Референтные значения концентрации сперматозоидов

Определение концентрации сперматозоидов у человека и хозяйственно значимых животных – рутинная процедура, регламентируемая ВОЗ и различными национальными и международными руководствами [WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 2010; Björndahl et al., 2010; Chenoweth, Lorton, 2014]. Для лабораторных животных, в том числе грызунов, также разработаны регламенты (предполагают иссечение и гомогенизацию придатков семенника) [Tayama et al., 2006; Behringer et al., 2014], однако поиск новых, оптимальных методов определения концентрации и связанных с ними методов отбора эякулированных или эпидидимальных сперматозоидов ведется до сих пор. В разных источниках можно встретить разнообразные способы определения концентрации (или абсолютного количества клеток) сперматозоидов грызунов, результаты которых трудно или невозможно сравнить между собой.

Одни исследователи помещают эпидидимисы грызунов в питательную среду (0.1 мл), затем аккуратно выдавливают из них пинцетом эпидидимальную жидкость, которая через семявыносящий проток попадает в среду. Полученную суспензию с помощью питательной среды доводят до нужного объема (2 мл) [Kruczek et al., 2013; Miska-Schramm et al., 2014, 2017]. По-видимому, таким способом можно получить не очень большое количество эпидидимальной жидкости, поскольку значения концентрации на несколько порядков (в 100 и более раз) ниже значений, полученных другими методами. Кроме того, этот метод кажется субъективным, поскольку показывает количество сперматозоидов, которое исследователи смогли выдавить, что вызывает сомнения в воспроизводимости результатов.

Другие исследователи также сначала помещают эпидидимисы в питательную среду, затем делают аккуратные надрезы (от 3 до 5) в дистальной части обоих эпидидимисов и в течение 2–10 мин дают сперматозоидам свободно

«выплыть» из разрезов эпидидимисов наружу [Gómez Montoto et al., 2011a; Tourmente et al., 2015]. Далее определяют концентрацию сперматозоидов в объеме питательной среды и пересчитывают на общее количество сперматозоидов в растворе. Полученные абсолютные значения общего количества сперматозоидов могут служить в качестве оценки «эпидидимального резерва» – общего количества клеток в эпидидимисах [Осадчук, Клещёв, 2016] – и хорошо коррелируют с оценкой, получаемой при гомогенизации эпидидимиса, при условии, что вязкость и диспергируемость эпидидимальной жидкости у разных видов одинакова.

Заметим, однако, что количество выплывших из эпидидимиса при обоих вышеописанных способах (с активным и пассивным «выплыванием» сперматозоидов) может зависеть от величины (длины и глубины) разреза органа. Если величина разреза одинакова, вне зависимости от размера органа, то количество выплывших клеток отражает концентрацию эпидидимальной жидкости, если разрез пропорционален размеру органа (зависит от его размера), то показатель отражает число сперматозоидов в органе (аналог эпидидимального резерва).

Третья группа исследователей предлагает гомогенизировать один [Tannenbaum et al., 2003, 2009; Tannenbaum, Beasley, 2016; Chen et al., 2021] или оба эпидидимиса [Осадчук, Клещёв, 2016]. Для этого его (их) взвешивают, измельчают, встряхивают в шейкере, затем фильтруют через нейлоновый фильтр [Осадчук, Клещёв, 2016]. L.V. Tannenbaum с соавт. добавляют в гомогенат флуоресцирующий краситель (Hoechst dye N33342) для окрашивания ДНК в головке сперматозоида. Для сравнения разных видов полученное количество клеток нормируют на массу гомогенизированного эпидидимиса и указывают количество клеток на единицу массы эпидидимиса [Tannenbaum et al., 2003, 2009; Tannenbaum, Beasley, 2016]. В случае, если используют оба эпидидимиса, получают оценку «истинного» эпидидимального резерва [Осадчук, Клещёв, 2016]. Однако полученный гомогенат содержит множество остатков размельченного

эпидидимиса, от которых необходимо избавляться дополнительным центрифугированием и фильтрацией.

Хотя метод гомогенизации кажется наиболее адекватным способом определения концентрации сперматозоидов, его нельзя использовать для анализа показателей подвижности. Первые два метода позволяют оценивать показатели подвижности и концентрации одновременно, но показатели подвижности в этом случае могут быть смещенными (более высокими) за счет того, что часть клеток с морфологическими дефектами, не способная к активному движению, может задерживаться в эпидидимисе.

Предложенный нами метод (см. раздел 2.5), позволяет исследовать одновременно показатели подвижности и концентрации сперматозоидов в эпидидимисах в нескольких повторностях, причем пробы (со всем спектром клеток, включая неспособных активно выплывать) могут быть отобраны не из одной и той же готовой «маточной» суспензии. Хотя мы пока не проводили сравнения с методом, который используют, например, M. Tourmente с соавт. (2015), наши данные косвенно свидетельствуют о том, что доля подвижных сперматозоидов может быть завышена при их свободном «выплывании».

С другой стороны, «заточенность» нашей методики на отбор эпидидимальных сперматозоидов для оценки подвижности не позволяет точно оценить общий запас клеток в хвостовой части придатков, хотя, по мнению ряда авторов, этот показатель чувствителен к воздействующим факторам [Chapin et al., 1997; Tannenbaum et al., 2003; Tayama et al., 2006; Chen et al., 2021].

Еще одно важное замечание касается степени подробности протоколов отбора и анализа подвижности и концентрации сперматозоидов грызунов: часто в описаниях отсутствуют важные детали, которые не позволяют в точности воспроизвести тот или иной метод другим исследователям. Авторы не указывают состав питательной среды и объемы, используемые для разведения клеточной суспензии, режимы центрифугирования при гомогенизации эпидидимисов и т.д. Учитывая это, мы старались максимально полно изложить все нюансы используемых нами методов и указать на возможные «подводные камни».

Ручное измерение концентрации сперматозоидов использовали для контроля аппаратного определения и для проверки воспроизводимости результатов. Значения концентраций при ручном и автоматическом измерении коррелировали (например, для основной выборки животных – $r = 0.63$, $p < 0.05$, значения концентраций логарифмированы).

Таким образом, несмотря на то, что в литературе приводятся данные о концентрации сперматозоидов для некоторых видов грызунов (в том числе для одного из исследуемых нами видов – рыжей полевки), их сравнение с нашими данными нельзя признать полностью корректным.

В Таблице 5.1 приведены концентрации сперматозоидов грызунов с фоновых участков, причем первые три группы значений представляют собой три степени генерализации данных, полученных с помощью CASA:

1) в 1 мл питательного раствора DMEM; в этом объеме разводили 0.5 мкл отобранной эпидидимальной жидкости;

2) в 1 мл эпидидимальной жидкости (пересчетное значение из (1), см. раздел 2.5); значения приведены для сравнения со значениями, полученными при ручном измерении (4), и для оценки *концентрированности* эпидидимальной жидкости;

3) приблизительное количество сперматозоидов в исследуемом правом эпидидимисе (аналог половины эпидидимального резерва); эти значения приведены для возможности сравнения наших данных с другими методами отбора материала, например при гомогенизации хвостов эпидидимисов (пересчетное значение из (1), см. раздел 2.5);

4) в 1 мл эпидидимальной жидкости; значения рассчитаны с помощью камеры ММС (см. раздел 2.5); значения приведены для сравнения с аппаратным определением значений концентрации (2).

Для дальнейших расчетов мы использовали значения концентрации сперматозоидов в 1 мл DMEM (CASA) (1), поскольку именно в этом объеме питательной среды определяли подвижность клеток и получали изначальное аппаратное значение концентрации.

Таблица 5.1 – Показатели концентрации (среднее \pm ошибка среднего) сперматозоидов грызунов с фоновых участков

Концентрация сперматозоидов	<i>Cl. glareolus</i> , <i>n</i> = 43	<i>Cl. rutilus</i> , <i>n</i> = 14	<i>S. uralensis</i> , <i>n</i> = 8
1) в 1 мл DMEM (CASA)	1.40E+6 \pm 6.83E+4 ^Б (5.53E+5 – 2.54E+6)	1.49E+6 \pm 1.20E+5 ^Б (8.09E+5 – 2.41E+6)	3.78E+5 \pm 7.56E+4 ^{Б, Б} (1.45E+5 – 7.14E+5)
2) в 1 мл эпидидимальной жидкости (CASA)	3.07E+9 \pm 1.50E+8 ^Б (1.22E+9 – 5.58E+9)	3.28E+9 \pm 4.44E+8 ^Б (1.78E+9 – 5.30E+9)	8.32E+8 \pm 1.66E+8 ^{Б, Б} (3.18E+8 – 1.57E+9)
3) в эпидидимисе (CASA)	1.31E+11 \pm 7.37E+9 ^{А, Б} (5.28E+10 – 4.45E+11)	8.21E+10 \pm 9.13E+9 ^{А, Б} (4.16E+10 – 1.53E+11)	1.86E+10 \pm 4.71E+9 ^{Б, Б} (5.41E+9 – 4.15E+10)
4) в 1 мл эпидидимальной жидкости (ММС)	5.28E+9 \pm 5.53E+8 ^Б 1.07E+9 – 1.82E+10	5.88E+9 \pm 7.86E+8 ^Б 2.00E+9 – 1.14E+10	1.00E+9 \pm 2.02E+8 ^{Б, Б} 4.80E+8 – 2.24E+9

Примечание – Значения показателей приведены в экспоненциальном формате (Е – экспонента, «10[^]»); приведены различия (тест Тьюки, $p < 0.05$) между: А – *Cl. glareolus* и *Cl. rutilus*, Б – *Cl. glareolus* и *S. uralensis*, В – *Cl. rutilus* и *S. uralensis*

5.2 Межвидовые различия показателей концентрации сперматозоидов

Как мы уже подчеркивали, оценить межвидовые различия показателей концентрации сперматозоидов можно только при определении их одинаковой методикой или даже одним коллективом авторов. Но и в этом случае результаты могут быть противоречивыми. Например, один и тот же коллектив авторов в одной работе показал, что у *Cl. glareolus* количество сперматозоидов было в 2.5 раза ниже, чем у *Ap. sylvaticus* [Gómez Montoto et al., 2011a], в другой, наоборот, в 2 раза выше [Tourmente et al., 2015].

Мы обнаружили, что концентрации сперматозоидов в DMEM (1) и в эпидидимальной жидкости (2) у *Cl. glareolus* и *Cl. rutilus* не различались, при этом у обоих видов полевок концентрация клеток была почти в 5 раз выше, чем у

малой лесной мыши. Общее количество сперматозоидов в эпидидимисе (3) различалось у всех трех видов (Таблица 5.1).

Отметим, что при отсутствии различий в концентрации сперматозоидов у полевок, абсолютная и относительная масса (индекс) семенника у рыжей полевки почти в 2 раза выше, чем у красной полевки. Различия в относительной массе семенников у грызунов используют в качестве показателя уровня конкуренции сперматозоидов [Gómez Montoto et al., 2011a]. Увеличение индекса семенника связывают как с увеличением количества ткани, продуцирующей сперматозоиды, так и с увеличением «эффективности» сперматогенеза на единицу ткани [Lüpold et al., 2009]. Это приводит к увеличению количества сперматозоидов в придатках семенника и семявыносящем протоке (резервах сперматозоидов), соответственно, и к увеличению количества сперматозоидов в эякуляте [Møller, 1988, 1989]. Перенос большего количества сперматозоидов во время копуляции увеличивает шансы на оплодотворение из-за значительных потерь сперматозоидов в женских путях [Suarez, 1987]. Таким образом, можно предположить, что уровень конкуренции сперматозоидов влияет не на их концентрацию, а на увеличение общего (абсолютного) количества сперматозоидов, что достигается увеличением органов продукции и запаса – семенника и эпидидимиса.

5.3 Концентрация сперматозоидов в разных популяционных группах

Влияние абсолютного возраста на концентрацию эпидидимальных сперматозоидов *Cl. glareolus* из лабораторной колонии обнаружили M. Kruczek с соавт. (2013): самая высокая концентрация была у 4-месячных самцов по сравнению с более молодыми и более старыми. Авторы также обнаружили, что к 6-месячному возрасту концентрация сперматозоидов уменьшалась в 2 раза и оставалась на этом уровне до конца репродуктивного периода (возраст 15 мес.).

В нашем эксперименте показатели концентрации эпидидимальных сперматозоидов грызунов (как и показатели подвижности) не зависели ни от принадлежности к той или иной группе, ни от района отловов: для *Cl. glareolus* – $t_{\text{группа}} = 0.56$, $p = 0.579$, $t_{\text{район}} = -0.25$, $p = 0.803$; для *Cl. rutilus* – $t_{\text{группа}} = -0.40$, $p =$

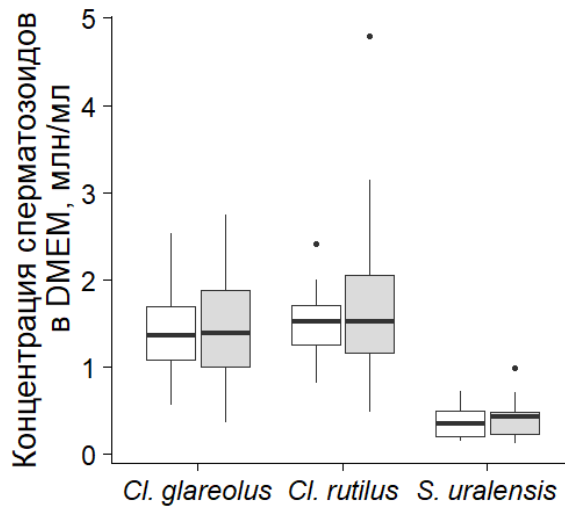
0.694, $t_{\text{район}} = -1.17$, $p = 0.246$; для *S. uralensis* – $t_{\text{группа}} = 0.55$, $p = 0.592$, $t_{\text{район}} = 1.24$, $p = 0.232$.

5.4 Влияние химического загрязнения

Поскольку эффекты факторов «район» и «группа» оказались незначимыми, для оценки влияния уровня загрязнения мы объединили животных разных групп и из разных районов. Однако у всех трех видов влияние зоны загрязнения на концентрацию сперматозоидов также оказалось незначимым: для *Cl. glareolus* $t = 0.37$, $p = 0.711$; для *Cl. rutilus* $t = 0.68$, $p = 0.497$; для *S. uralensis* $t = 0.48$, $p = 0.638$.

Несмотря на то, что эффектов, связанных с зоной загрязнения, не обнаружено, у обоих видов полевок самые низкие значения показателей концентрации сперматозоидов встречались на импактных участках. Кроме того, у красной полевки изменчивость показателей концентрации на импактных участках была выше, чем на фоновых: $CV_{\text{Bg}} = 30.03$, $CV_{\text{Im}} = 49.83$; $F = 3.37$, $p = 0.022$ (Рисунок 5.1).

Как мы уже отмечали ранее, в токсикологических экспериментах иногда обнаруживают дозовую зависимость между уровнями токсикантов и показателями подвижности сперматозоидов. У опытной группы *Cl. glareolus* из лабораторной колонии при затравке сульфатом меди и хлоридом алюминия обнаружено снижение концентрации эпидидимальных сперматозоидов по сравнению с контрольными животными [Miska-Schramm et al., 2014, 2017]. Снижение концентрации сперматозоидов происходило вследствие уменьшения сперматогенного индекса ткани семенника. Авторы предположили, что уменьшение количества сперматозоидов связано с увеличением количества тестостерона (так называемой тестостероновой перегрузкой), поскольку тестостерон в больших количествах подавляет выработку сперматозоидов, а также секрецию гормонов гипоталамуса, участвующих в стероидогенезе [Matsumoto et al., 1986].



фоновые участки – без заливки, импактные участки – серая заливка; горизонтальная черта – медиана, границы ящика – межквартильный размах, усы – минимальное и максимальное значения, не превышающие 1.5 межквартильных размаха, точка – выброс;

* – различия при $p < 0.05$

Рисунок 5.1 – Концентрация (млн/мл) эпидидимальных сперматозоидов грызунов с фоновых и импактных участков

Неоднократно цитируемые L.V. Tannenbaum с соавт. также не обнаружили различий в концентрации сперматозоидов грызунов на фоновых и загрязненных территориях. Значения этого показателя ни разу не достигали пороговых (снижения концентрации на 60 %, а в более ранней работе 2003 г. – на 80 %) [Tannenbaum et al., 2003, 2007, 2009; Tannenbaum, Beasley, 2016].

Глава 6. ВЛИЯНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНОЙ ТОКСИЧЕСКОЙ НАГРУЗКИ НА СПЕРМАТОЗОИДЫ

6.1 Факторы накопления тяжелых металлов грызунами

Тяжелые металлы – широкая группа элементов, значение которых в различных областях знания оценивают по-разному. В биологических науках для включенных в эту категорию веществ значимы не только химические и физические свойства элементов (например, их атомная масса или плотность), но и их биологическая активность и токсичность для организмов [Справочник по гидрохимии, 1998]. Тяжелые металлы, которые участвуют в биологических процессах и в определенных количествах необходимы для функционирования организма (например, медь, цинк, железо), относят к эссенциальным микроэлементам. Тяжелые металлы, не имеющие такой «полезной» функции в биологических процессах (кадмий, свинец, ртуть и др.), считают токсичными [Справочник по гидрохимии, 1998; Курляндский и др., 2002].

В медицинской токсикологии тяжелые металлы относят к так называемым «тиоловым ядам», главный механизм токсического действия которых связан с угнетением ферментных систем в результате блокирования сульфгидрильных (SH-) и других функциональных групп в активных центрах и иных биологически важных участках белковых молекул, что ведет к нарушению обменных процессов в организме [Гольдштейн, 1959; Трахтенберг, 1969; Курляндский и др., 2002].

Важнейший источник поступления тяжелых металлов в окружающую среду – горнодобывающая и металлургическая промышленность [Безель, 2006]. Главным долговременным депо для металлов следует считать почву – основу всех биогеохимических циклов в природных экосистемах [Безель, 2006; Воробейчик, Кайгородова, 2017]. Растения, произрастающие на загрязненной почве, накапливают значительные концентрации тяжелых металлов, затем эти растения могут поедаться травоядными животными [Wijnhoven et al., 2007]. Как следствие, в тканях таких животных обнаруживают значительные концентрации различных

металлов [Gdula-Argasińska et al., 2004; Wijnhoven et al., 2007; Nikolov et al., 2010; Martiniaková et al., 2011; Martiniakova et al., 2012; Ullah et al., 2014; Zounkova et al., 2014; Мухачева, 2017].

Концентрации тяжелых металлов в почве, организме животных (в том числе мелких млекопитающих) и их кормовых объектов представляют собой ценную информацию о перемещении, накоплении и потенциальном токсическом воздействии металлов на окружающую среду [Torres, Johnson, 2001; Безель, 2006; Wijnhoven et al., 2007].

Данные об индивидуальных уровнях накопления тяжелых металлов в органах и тканях животных служат индикатором нагрузки на организм и позволяют выявить связь между уровнем загрязнения среды и патологиями в органах животных, т. е. определить степень опасности токсического воздействия [Damek-Poprawa, Sawicka-Kapusta, 2004; Sánchez-Chardi et al., 2009a, 2009b; Tête et al., 2014].

При изучении влияния загрязнения на репродуктивную систему самцов кажется логичным измерять концентрации тяжелых металлов непосредственно в половых железах, в первую очередь, семенниках. Однако неоднократно было показано, что семенники надежно защищены от поступления и действия токсикантов гематотестикулярным барьером [Marchlewicz, 1994; Mruk, Cheng, 2015]. Обнаруживаемые при затравке у лабораторных животных микроморфологические изменения репродуктивных органов связывают с опосредованным влиянием тяжелых металлов на весь организм [Levin et al., 1983; Parizek, 1983]. Об общей интоксикации организма грызунов из природных популяций свидетельствовали различные нарушения в микроциркуляторном русле семенника (изменения эндотелия сосудов, геморрагии и др.), тогда как в его генеративном компоненте – извитых семенных канальцах – не обнаруживали нарушений, связанных с действием токсикантов [Давыдова, 2007].

Уровни накопления токсикантов в репродуктивных органах грызунов с загрязненных территорий оценивают как крайне низкие. На примере рыжей полевки, обитающей в окрестностях крупных металлургических предприятий,

показано, что концентрации кадмия, меди и цинка в семенниках животных с фоновых и загрязненных участков не различались [Damek-Poprawa, Sawicka-Karusta, 2004; Мухачева, Давыдова, 2009]. Как правило, для оценки индивидуальной токсической нагрузки на организм исследуют органы преимущественного депонирования тяжелых металлов – печени, почек, костей скелета [Мухачева, Безель, 1995; Воробейчик и др., 2006; Безель и др., 2007; Wijnhoven et al., 2007; Sánchez-Chardi et al., 2009a; Tête et al., 2014; Мухачева, 2017].

Мы исследовали концентрации эссенциальных (Cu и Zn) и токсичных (Cd и Pb) элементов в печени (Таблица 6.1) трех модельных видов (*Cl. glareolus*, *Cl. rutilus*, *S. uralensis*) из расширенной выборки (Таблица 2.8).

Печень относят к основным органам-мишеням для тяжелых металлов [Hébert et al., 1993; Aburto et al., 2001]. Клетки печени могут аккумулировать значительное количество ионов металлов без какого-либо ущерба для организма [Linder, 2001]. Однако в крайних случаях избыточное накопление элементов приводит к повреждению клеток и органов и нарушению их функций [Evans, Abraham, 1973; Amiard-Triquet et al., 1986; Nikolov et al., 2010].

Таблица 6.1– Концентрации тяжелых металлов (мкг/г сухой массы) в печени грызунов (самцов и самок) с фоновых и импактных участков в районах СУМЗ и КМК (2017–2020 гг.)

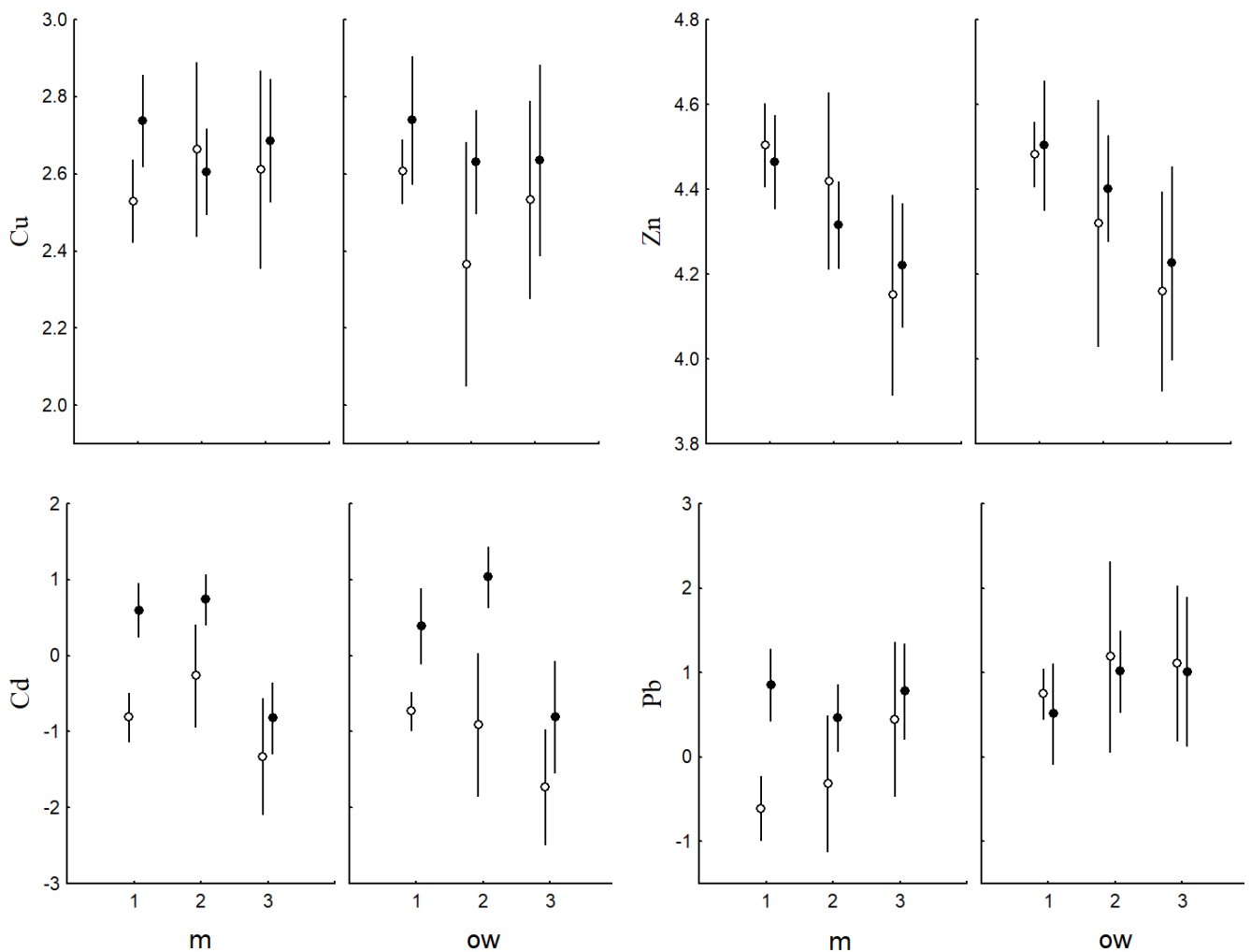
Элемент	Район	Зона загрязнения	<i>Cl. glareolus</i>		<i>Cl. rutilus</i>		<i>S. uralensis</i>	
			m, n = 58	ow, n = 79	m, n = 45	ow, n = 28	m, n = 20	ow, n = 13
Cu	СУМЗ	Bg	15.3 ± 0.55 11.9 – 19.2	16.2 ± 0.79 10.5 – 43.2	17.5 ± 0.71 16.8 – 18.2	13.7	11.4 ± 0.24 11.2 – 11.7	13.1 ± 1.71 11.4 – 14.8
		Im	15.1 ± 1.04 5.8 – 20.2	14.2 ± 0.83 10.2 – 22.0	13.1 ± 0.57 9.9 – 19.8	13.8 ± 1.07 9.5 – 20.5	15.3 ± 1.31 10.0 – 19.5	15.4 ± 1.03 12.7 – 18.6
	КМК	Bg	11.8 ± 1.08 2.3 – 19	12 ± 0.57 5.0 – 16.0	12.8 ± 1.26 4.4 – 16.7	8.8 ± 1.09 3.4 – 13.1	16.3 ± 1.00 14.4 – 18.2	12.3 ± 1.03 10.7 – 15.2
		Im	17.2 ± 1.53 9.5 – 23.5	17.5 ± 1.50 13.1 – 19.5	14.5 ± 0.84 8.1 – 18.7	14.6 ± 0.95 11.8 – 19.7	14.8 ± 1.26 10.5 – 18.5	13 ± 2.54 10.5 – 15.5
Zn	СУМЗ	Bg	81.2 ± 2.08 65.6 – 90.9	86.7 ± 2.04 56.5 – 117.5	88.1 ± 4.37 83.8 – 92.5	84.4	44.5 ± 3.58 40.9 – 48.1	61.6 ± 3.82 57.8 – 65.4
		Im	83.9 ± 4.15 45.8 – 105.8	83 ± 3.16 52.8 – 98.3	73.2 ± 4.43 45.0 – 133.7	79.1 ± 4.13 59.6 – 101.6	55 ± 6.32 32.7 – 77.4	66.3 ± 1.96 63.0 – 73.3
	КМК	Bg	106.1 ± 8.75 59.2 – 235.6	143.3 ± 64.43 61.1 – 1237.7	79.9 ± 4.04 41.9 – 95.3	68.5 ± 5.74 52.4 – 90.3	93.1 ± 12.29 70.5 – 127.4	68.7 ± 10.25 54.8 – 98.5
		Im	93.4 ± 5.07 68.8 – 112	100.2 ± 7.26 78.7 – 110.6	82.5 ± 6.96 37.6 – 117.7	86.2 ± 4.36 68.8 – 105.6	88.8 ± 5.07 72.7 – 115.3	71.2 ± 7.25 63.9 – 78.4

Продолжение таблицы 6.1

Элемент	Район	Зона загрязнения	<i>Cl. glareolus</i>		<i>Cl. rutilus</i>		<i>S. uralensis</i>	
			m, n = 58	ow, n = 79	m, n = 45	ow, n = 28	m, n = 20	ow, n = 13
Cd	СУМЗ	Bg	0.7 ± 0.09 0.1 – 1.2	0.7 ± 0.07 0.1 – 2.2	1.3 ± 0.10 1.2 – 1.4	0.6	0.9 ± 0.57 0.3 – 1.4	0.2 ± 0.08 0.1 – 0.3
		Im	6.3 ± 1.43 0.2 – 18	2.7 ± 0.55 0.7 – 7.5	3.3 ± 0.60 0.2 – 11.8	3.3 ± 0.57 0.6 – 8.1	0.9 ± 0.20 0.2 – 1.7	0.8 ± 0.20 0.3 – 1.5
	КМК	Bg	0.6 ± 0.11 0 – 1.4	0.6 ± 0.13 0.1 – 2.0	0.6 ± 0.11 0.2 – 1.5	0.5 ± 0.20 0.1 – 1.6	0.2 ± 0.14 0 – 0.6	0.2 ± 0.08 0.1 – 0.4
		Im	1.0 ± 0.19 0.3 – 2.2	1.2 ± 0.39 0.5 – 2.3	2.5 ± 0.68 0.7 – 7.9	4.6 ± 1.65 0.9 – 12.1	0.3 ± 0.07 0.1 – 0.6	0.3 ± 0.11 0.2 – 0.4
Pb	СУМЗ	Bg	0.4 ± 0.10 0.1 – 1.3	3.0 ± 0.47 0.1 – 10.0	0.3 ± 0.12 0.1 – 0.4	4.9	2.5 ± 0.82 1.6 – 3.3	2.5 ± 0.11 2.4 – 2.6
		Im	1.9 ± 0.45 0.3 – 6.4	1.5 ± 0.35 0 – 5.0	2 ± 0.40 0 – 7.0	2.9 ± 0.77 0.1 – 8.8	1.5 ± 0.61 0.2 – 4.7	2.4 ± 1.70 0.5 – 9.2
	КМК	Bg	1.6 ± 0.33 0.1 – 5.2	3.5 ± 0.42 0.9 – 6.7	2.9 ± 0.55 1 – 6.4	3.4 ± 1.17 0.4 – 8.5	1.4 ± 0.6 0.4 – 2.9	4.0 ± 0.80 2.2 – 5.9
		Im	5.2 ± 0.95 0.9 – 8.9	3.3 ± 0.53 2.1 – 4.6	3.1 ± 0.88 0.2 – 9.0	5.3 ± 0.94 0.9 – 9.6	5.7 ± 0.87 2.0 – 9.0	6.4 ± 1.07 5.4 – 7.5

Примечание – Зона загрязнения: Bg – фоновая, Im – импактная; популяционная группа: m – половозрелые сеголетки, ow – перезимовавшие особи; приведены среднее ± ошибка среднего, минимальные и максимальные значения показателей; количество особей в каждой группе см. в Таблице 2.8

Исследуемые нами факторы (район, зона, вид, группа) по-разному влияли на накопление тяжелых металлов грызунами (Рисунок 6.1, Таблица 6.2). Фактор «район» влиял на содержание цинка, кадмия и свинца: грызуны в районе СУМЗ накапливали в печени больше кадмия, но меньше цинка и свинца. Фактор «зона» влиял на накопление меди и кадмия: на импактных участках концентрации элементов в печени животных были выше. Концентрация цинка и кадмия была выше в печени полевок, чем у малой лесной мыши, а концентрация свинца – выше у перезимовавших животных, чем у половозрелых сеголеток.



1 – *Cl. glareolus*, 2 – *Cl. rutilus*, 3 – *S. uralensis*; m – половозрелые сеголетки,
ow – перезимовавшие особи

Рисунок 6.1 – Концентрации (мкг/г) меди, цинка, кадмия и свинца в печени (среднее, ДИ, значения логарифмированы) грызунов (самцов и самок) разных популяционных групп

Таблица 6.2 – Влияние факторов на накопление тяжелых металлов в печени половозрелых самцов и самок (сеголетки и перезимовавшие особи) модельных видов грызунов с фоновых и импактных участков в районах СУМЗ и КМК (2017–2020 гг.)

Элемент	Фактор	MS	F	$p \leq$
Cu	Район	0.17	1.92	0.1672
	Зона загрязнения	0.40	4.47	0.0356
	Вид	0.09	0.99	0.3731
	Группа	0.08	0.89	0.3473
Zn	Район	0.64	8.37	0.0042
	Зона загрязнения	0.01	0.10	0.7580
	Вид	0.94	12.43^Б	0.0001
	Группа	0.00	0.00	0.9586
Cd	Район	13.85	17.36	0.0001
	Зона загрязнения	36.30	45.49	0.0001
	Вид	13.99	17.53^{Б,В}	0.0001
	Группа	0.58	0.73	0.3935
Pb	Район	19.70	17.19	0.0001
	Зона загрязнения	3.27	2.85	0.0925
	Вид	2.30	2.01	0.1366
	Группа	11.99	10.46	0.0014

Примечание – Приведены различия (тест Стьюдента, $p < 0.05$) между: А – *Cl. glareolus* и *Cl. rutilus*, Б – *Cl. glareolus* и *S. uralensis*, В – *Cl. rutilus* и *S. uralensis*; полужирным шрифтом выделены значимые эффекты

Полученные нами данные в целом подтверждают установленные другими авторами закономерности накопления тяжелых металлов у мелких млекопитающих:

1) Животные на загрязненных территориях накапливают больше токсикантов, чем на фоновых территориях [Hunter et al., 1987; Talmage, Walton,

1991; Pankakoski et al., 1994; Мухачева, Безель, 1995; Pereira et al., 2006; Rogival et al., 2007; Wijnhoven et al., 2007; Levengood, Heske, 2008; Tête et al., 2014; Мухачева, 2017; Безель, Мухачева, 2020]. Несмотря на очевидность этого тезиса, связь концентрации тяжелых металлов в организме с загрязнением обнаруживают не всегда. Причины этого различны – от уровня загрязнения и разного «поведения» эссенциальных и токсичных элементов в организме до специфичности аккумуляирования разных элементов разными видами, популяционными группами, индивидуумами и органами. В качестве примера можно привести отсутствие значимых различий в накоплении свинца у грызунов с фоновых и импактных участков (Таблица 6.2). Это объясняется тем, что в отличие от костей скелета, печень слабо депонирует этот элемент.

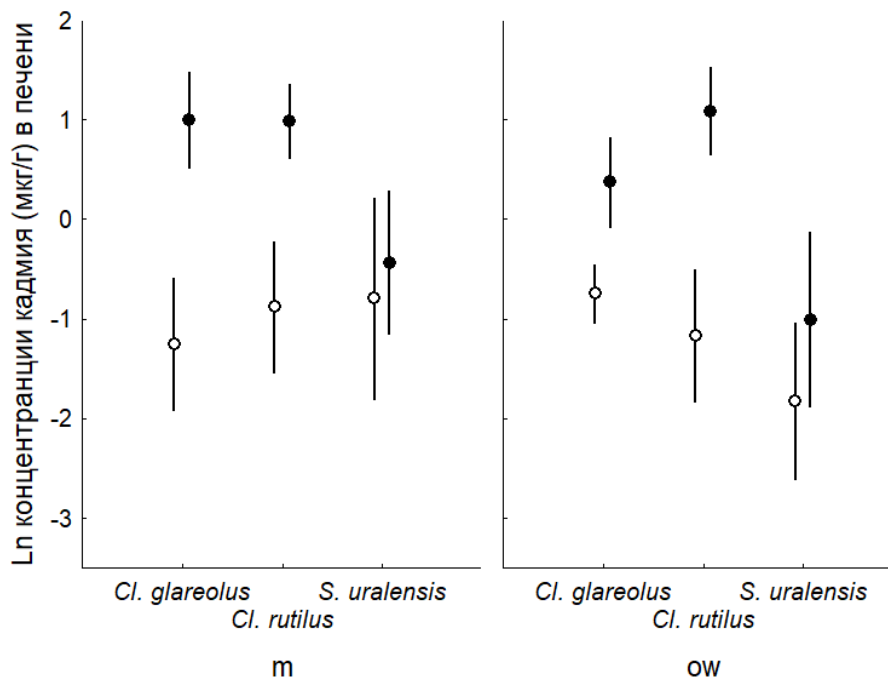
2) Накопление токсикантов связано с возрастом: их концентрации выше у взрослых животных, чем у молодых [Hunter et al., 1987; Pankakoski et al., 1994; Beernaert et al., 2007; Rogival et al., 2007; Wijnhoven et al., 2007; Sánchez-Chardi et al., 2009b]. В работе С.В. Мухачевой и В.С. Безеля (1995) показано, что перезимовавшие особи на всех участках токсического градиента в районе СУМЗ накапливают кадмия в печени больше (на фоновых – 1.63, буферных – 10.57, импактных – 16.67 мкг/г), чем сеголетки (1.87, 8.36 и 13.10 мкг/г, соответственно) [Мухачева, Безель, 1995].

3) Разные виды/таксоны мелких млекопитающих по-разному накапливают токсиканты. Более низкие концентрации элементов у мышей по сравнению с полевками обычно объясняют особенностями их биологии – преимущественным питанием семенами, максимально защищенными от токсического воздействия, большей подвижностью и др. [Hunter et al., 1987; Talmage, Walton, 1991; Heske et al., 2003; Wijnhoven et al., 2007; Schipper et al., 2008].

Обнаруженные различия в накоплении Zn, Cd и Pb грызунами из разных районов (в районе СУМЗ животные накапливали больше кадмия, в районе КМК – больше цинка и свинца) также были ожидаемы. Они могут быть объяснены особенностями технологических циклов производства, систем фильтрации, составом обрабатываемого сырья и т.д. [Воробейчик и др., 2006].

6.2 Связь показателей сперматозоидов с индивидуальной токсической нагрузкой

Для основной выборки (Таблица 2.5) получили результаты, сходные с результатами для большой выборки (см. раздел 5.1). Так, на накопление кадмия влияли следующие факторы: «район» – возле СУМЗ грызуны накапливали этого элемента больше ($F(1, 129) = 12.18, p = 0.0066$), «зона загрязнения» – на импактных участках животные накапливали больше, чем на фоновых ($F(1, 129) = 57.7, p < 0.0001$), «вид» – полевки накапливали больше, чем малая лесная мышь ($Cl. rutilus > Cl. glareolus > S. uralensis, F(2, 129) = 8.2, p < 0.0001$). Влияние варианта онтогенеза на накопление кадмия оказалось незначимым ($F(1, 129) = 2.8, p = 0.0961$) (Рисунок 6.2, Таблица 6.3).



белый маркер – фоновые участки, черный маркер – импактные участки;

m – половозрелые сеголетки, ow – перезимовавшие особи

Рисунок 6.2 – Концентрации кадмия в печени (среднее, ДИ, значения логарифмированы) у грызунов с фоновых и импактных участков

Таблица 6.3 – Концентрации тяжелых металлов (мкг/г сухой массы) в печени самцов модельных видов грызунов с фоновых и импактных участков в районах СУМЗ и КМК (2018–2020 гг.)

Элемент	Район	Зона загрязнения	<i>Cl. glareolus</i>		<i>Cl. rutilus</i>		<i>S. uralensis</i>	
			m, n = 20	ow, n = 51	m, n = 29	ow, n = 23	m, n = 9	ow, n = 9
Cu	СУМЗ	Bg	–	15.2 ± 1.28 10.5 – 43.2	16.8	13.7	11.4 ± 0.24 11.2 – 11.7	13.1 ± 1.71 11.4 – 14.8
		Im	12.7 ± 1.09 5.8 – 15.1	13.3 ± 0.79 10.2 – 16.7	13 ± 0.71 9.9 – 19.8	12.6 ± 0.95 9.5 – 16.6	12.1 ± 1.04 10 – 13.5	12.7
	КМК	Bg	11.6 ± 1.80 2.3 – 16.5	11.2 ± 0.69 5.0 – 13.9	14.8 ± 0.50 13.0 – 16.6	8.8 ± 1.29 3.4 – 13.1	17.8	11.4 ± 0.55 10.7 – 12.5
		Im	16.7 ± 2.42 9.5 – 23.5	17.5 ± 1.50 13.1 – 19.5	15.2 ± 0.62 13.7 – 17.2	14.5 ± 1.09 11.8 – 19.7	11.5 ± 1.01 10.5 – 12.6	13 ± 2.54 10.5 – 15.5
Zn	СУМЗ	Bg	–	80.2 ± 5.85 56.5 – 102.2	83.8	84.4	44.5 ± 3.58 40.9 – 48.1	61.6 ± 3.82 57.8 – 65.4
		Im	75.4 ± 7.40 45.8 – 94.4	84.2 ± 6.78 52.8 – 98.3	73.3 ± 8.68 45.0 – 133.7	78.9 ± 6.06 59.6 – 101.6	39.2 ± 4.04 32.7 – 43.3	63.9
	КМК	Bg	95 ± 13.09 59.2 – 130.9	75.9 ± 4.98 61.1 – 89.7	76.5 ± 7.42 41.9 – 95.3	68 ± 6.27 52.4 – 90.3	81.9	58.8 ± 4.39 54.8 – 66
		Im	89.2 ± 7.24 68.8 – 109.8	100.2 ± 7.26 78.7 – 110.6	87.5 ± 5.72 75.9 – 114.8	88 ± 4.63 68.8 – 105.6	77.2 ± 4.53 72.7 – 81.7	71.2 ± 7.25 63.9 – 78.4

Продолжение таблицы 6.3

Элемент	Район	Зона загрязнения	<i>Cl. glareolus</i>		<i>Cl. rutilus</i>		<i>S. uralensis</i>	
			m, n = 20	ow, n = 51	m, n = 29	ow, n = 23	m, n = 9	ow, n = 9
Cd	СУМЗ	Bg	–	0.6 ± 0.10 0.2 – 2.2	1.4	0.6	0.9 ± 0.57 0.3 – 1.4	0.2 ± 0.08 0.1 – 0.3
		Im	7.4 ± 2.10 0.2 – 17.3	2.1 ± 0.56 0.7 – 6.9	3.8 ± 0.68 0.9 – 11.8	3.2 ± 0.73 0.6 – 8.1	1.2 ± 0.31 0.7 – 1.7	0.3
	КМК	Bg	0.6 ± 0.20 0 – 1.4	0.5 ± 0.15 0.1 – 2	0.4 ± 0.10 0.2 – 0.8	0.5 ± 0.24 0.1 – 1.6	0.2	0.2 ± 0.10 0.1 – 0.4
		Im	1.4 ± 0.28 0.7 – 2.2	1.2 ± 0.39 0.5 – 2.3	2.8 ± 1.20 0.7 – 7.9	5.1 ± 1.80 1.2 – 12.1	0.3 ± 0.08 0.2 – 0.3	0.3 ± 0.11 0.2 – 0.4
Pb	СУМЗ	Bg	–	3.4 ± 0.61 0.1 – 9.3	0.4	4.9	2.5 ± 0.82 1.6 – 3.3	2.5 ± 0.11 2.4 – 2.6
		Im	2.6 ± 0.83 0.3 – 6.4	1.7 ± 0.45 0 – 5.0	1.8 ± 0.36 0 – 5.1	2.6 ± 0.72 0.1 – 7	2.5 ± 1.28 0.2 – 4.7	9.2
	КМК	Bg	1.1 ± 0.49 0.1 – 3.5	3.7 ± 0.52 0.9 – 6.7	3 ± 0.75 1.1 – 6.4	3.0 ± 1.29 0.4 – 8.5	2.9	4.2 ± 1.07 2.2 – 5.9
		Im	4.8 ± 1.35 0.9 – 8.8	3.3 ± 0.53 2.1 – 4.6	4.0 ± 1.37 0.2 – 9.0	5.2 ± 1.07 0.9 – 9.6	6.6 ± 2.32 4.3 – 9.0	6.4 ± 1.07 5.4 – 7.5

Примечание – Зона загрязнения: Bg – фоновая, Im – импактная; популяционная группа: m – половозрелые сеголетки, ow – перезимовавшие особи; приведены среднее ± ошибка среднего, минимальные и максимальные значения показателей; прочерк означает отсутствие данных; количество особей в каждой группе см. в Таблице 2.5

Показатели эпидидимальных сперматозоидов по-разному были связаны с индивидуальной токсической нагрузкой.

У рыжей полевки обнаружили слабую отрицательную связь между концентрацией *токсичных* элементов и подвижностью сперматозоидов: с увеличением концентрации кадмия уменьшались значения скоростных характеристик подвижности VCL, VSL, VAP ($r = -0.25 - -0.31, p < 0.05$), с увеличением концентрации свинца уменьшалась степень прямолинейности движения LIN ($r = -0.30, p < 0.05$), частота колебания головки BCF ($r = -0.39, p < 0.05$) и увеличивалась амплитуда движения головки ALH ($r = 0.30, p < 0.05$). Концентрация свинца также отрицательно коррелировала и с частотой встречаемости сперматозоидов с дефектами головки ($r = -0.24, p < 0.05$).

У красной полевки обнаружили слабую отрицательную связь ($r = -0.36 - -0.39, p < 0.05$) между концентрацией меди и показателями подвижности сперматозоидов (VCL, VSL, VAP).

У малой лесной мыши корреляций между концентрациями металлов и показателями сперматозоидов не обнаружили.

Нелинейность связи индивидуальной токсической нагрузки и эффекта (или дозы-эффекта) в первую очередь обусловлена действием ряда биологических барьеров (гастроэнтеральный, гематотестикулярный). Кроме того, отсутствие токсических эффектов объясняют небольшими выборками, спецификой видов, в том числе, особенностями их диеты (многокомпонентным составом рационов и его различиями на разных территориях), мозаичностью загрязнения и т.д. [Tannenbaum et al., 2003, 2007; Au, 2004; Damek-Poprawa, Sawicka-Kapusta, 2004; Безель, 2006; Brumbaugh et al., 2010; Мухачева, 2017].

Глава 7. СВЯЗИ МЕЖДУ МОРФОЛОГИЕЙ, ПОДВИЖНОСТЬЮ И КОНЦЕНТРАЦИЕЙ СПЕРМАТОЗОИДОВ

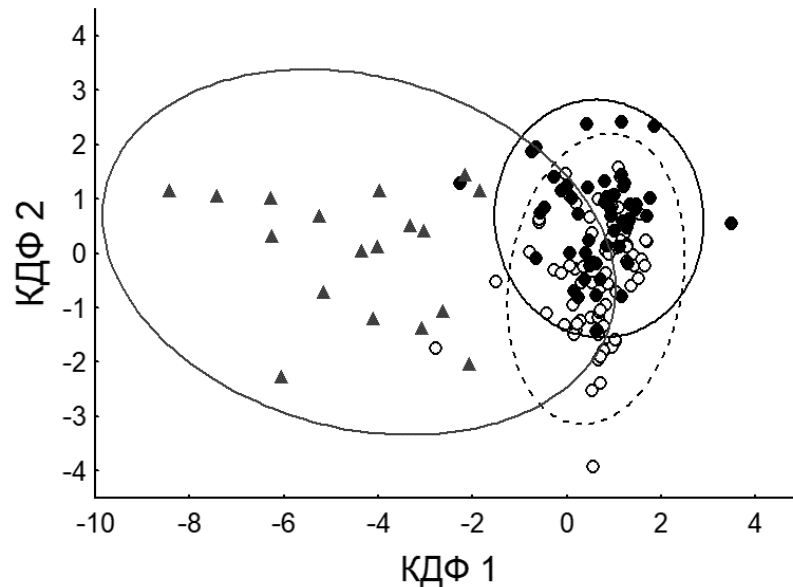
В предыдущих главах каждая группа показателей сперматозоидов – морфологии, подвижности и концентрации – рассматривалась отдельно. Это позволило подробно описать методические аспекты анализа каждой группы, оценить меж- и внутривидовую (онтогенетическую) изменчивость показателей, сравнить полученные результаты с литературными данными. Однако не меньший интерес представляют анализ дифференциации видов по комплексу изученных показателей и анализ степени согласованности изменений между группами показателей сперматозоидов. Для этого в данной главе оценили структуру связей между факторами и качеством сперматозоидов, а также вклад разных показателей сперматозоидов грызунов в межвидовые различия. Связи анализировали между наиболее информативными показателями, выбранными по результатам анализа главных компонент.

Исследованные виды существенно различались по показателям подвижности (скорость и прямолинейность движения, доля подвижных клеток) и концентрации эпидидимальных сперматозоидов, но морфологические показатели (доля клеток с дефектами головки и хвоста) оказались незначимы для их дифференциации (Таблица 7.1).

В первую каноническую функцию (КДФ 1, объясняет 91.6 % дисперсии) наибольший вклад вносила концентрация, прямолинейность движения (STR) и доля подвижных клеток (Motile), во вторую (КДФ 2, объясняет 8.6 % дисперсии) – скорость движения сперматозоидов (VCL). Различия сперматозоидов ожидаемо были максимальными между полевками и малой лесной мышью, минимальными – между видами полевок (Рисунок 7.1, Таблица 7.2).

Таблица 7.1 – Вклад показателей сперматозоидов грызунов в межвидовые различия (результаты дискриминантного анализа, $F(12, 266) = 27.2, p < 0.0001$)

Показатель	Wilks' Lambda	$F(2, 133)$	$p \leq$
Доля клеток с дефектами головки	0.202	0.1	0.902
Доля клеток с дефектами хвоста	0.203	0.3	0.766
Концентрация клеток	0.411	68.9	0.001
STR	0.262	19.7	0.001
Motile	0.251	16.2	0.001
VCL	0.245	14.3	0.001



белый круглый маркер – *Cl. glareolus*, черный круглый маркер – *Cl. rutilus*,
треугольный маркер – *S. uralensis*; эллипсы – 95 % ДИ

Рисунок 7.1 – Распределение особей трех видов грызунов по показателям сперматозоидов (доля клеток с дефектами головки и хвоста, концентрация, STR, Motile, VCL) в пространстве двух канонических дискриминантных функций (КДФ 1, КДФ 2)

Таблица 7.2 – Межвидовые различия грызунов по показателям сперматозоидов (результаты дискриминантного анализа)

Вид	<i>Cl. glareolus</i>	<i>Cl. rutilus</i>	<i>S. uralensis</i>
<i>Cl. glareolus</i>		1.2	25.5
<i>Cl. rutilus</i>	5.9		26.3
<i>S. uralensis</i>	58.9	56.5	

Примечание – Приведены расстояния Махаланобиса (над диагональю) и значения F статистик ($p < 0.0001$) (под диагональю)

О существенных межвидовых различиях показателей сперматозоидов грызунов свидетельствуют и результаты анализа структуры связей между предикторами и зависимыми переменными, проведенного для объединенной выборки ($n = 141$) (Таблица 7.3).

Поскольку факторная нагрузка для предиктора «вид» имела максимальное значение (0.61), далее структуру связей между переменными для каждого вида оценивали отдельно.

У *Cl. glareolus* на первые два фактора приходилось 57.1 % общей дисперсии, у *Cl. rutilus* – 52.7 %, у *S. uralensis* – 55.6 % (Таблица 7.3).

Некоторые из изученных показателей сперматозоидов были одинаково связаны у разных видов, например, у обоих видов полевок доля подвижных сперматозоидов (Motile) положительно связана со скоростью движения (VCL, $r = 0.3 - 0.4$), а концентрация клеток отрицательно – с прямолинейностью движения (STR, $r = -0.4 - -0.8$) (Рисунок 7.2) [Смирнов и др., 2022].

Хотя мы не обнаружили значимой связи между долей подвижных (Motile) и долей клеток с дефектами хвоста, эти два показателя оказались разнонаправлены: у всех видов грызунов при увеличении доли аномальных клеток доля подвижных клеток уменьшалась.

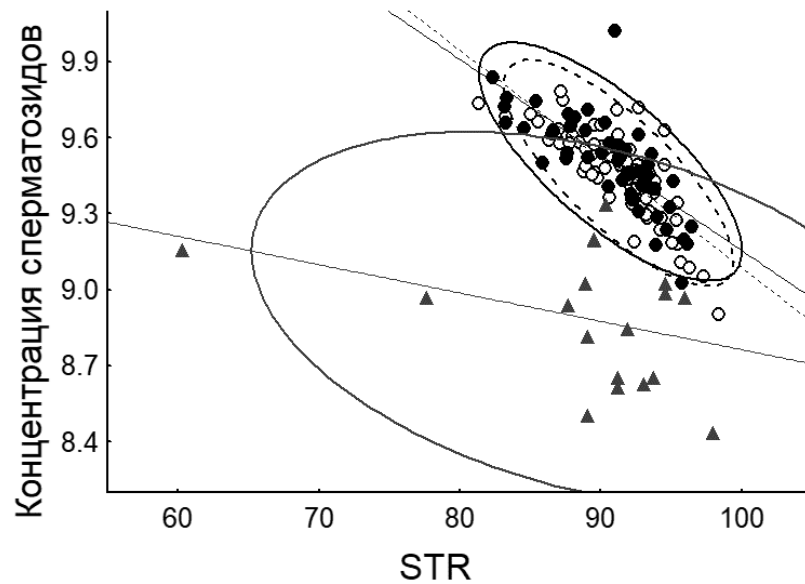
Таблица 7.3 – Структура связей между предикторами и показателями сперматозоидов грызунов (результаты анализа главных компонент)

Показатель / «Предиктор»	Все виды, $n = 141$	<i>Cl. glareolus</i> , $n = 71$	<i>Cl. rutilus</i> , $n = 52$	<i>S. uralensis</i> , $n = 18$
--------------------------	------------------------	------------------------------------	----------------------------------	-----------------------------------

	Factor 1	Factor 2	Factor 1	Factor 2	Factor 1	Factor 2	Factor 1	Factor 2
Доля клеток с дефектами головки	0.15	0.34	-0.19	-0.40	0.04	-0.65	-0.62	0.37
Доля клеток с дефектами хвоста	-0.56	-0.08	-0.46	-0.25	-0.24	0.16	-0.15	0.83
Концентрация клеток	0.77	-0.33	0.72	-0.62	0.90	0.20	0.31	0.41
VCL	0.49	0.18	0.57	0.55	0.42	-0.49	-0.78	0.30
STR	-0.23	0.89	-0.88	0.35	-0.89	-0.23	-0.72	-0.42
Motile	0.34	-0.12	0.57	0.30	0.16	-0.72	-0.61	-0.25
«Район»	-0.05	-0.03	-0.03	0.03	-0.14	-0.05	0.24	0.36
«Зона загрязнения»	-0.19	-0.05	-0.24	-0.31	-0.02	0.25	-0.31	0.33
«Вид»	-0.61	-0.23	–	–	–	–	–	–
«Группа»	0.07	0.07	0.03	0.24	0.02	-0.11	0.42	-0.57
«Cu»	0.04	-0.03	0.11	0.02	-0.09	0.24	-0.29	0.17
«Zn»	0.39	0.09	0.16	-0.12	0.06	0.16	-0.28	-0.08
«Cd»	0.15	-0.12	-0.09	-0.36	0.25	0.18	-0.20	0.28
«Pb»	-0.05	-0.17	0.20	-0.03	0.01	-0.01	0.25	-0.04
Доля общей дисперсии, %	30.8	19.9	34.5	22.6	31.2	21.5	33.4	22.2

Примечание – Предикторы выделены кавычками, максимальные нагрузки для каждого фактора – полужирным шрифтом, прочерк означает отсутствие данных

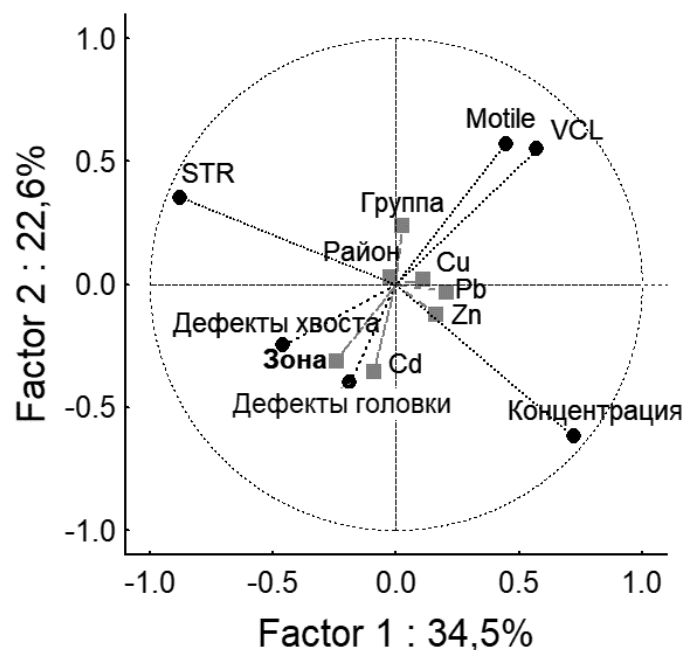
Анализ структуры связей также показал, что факторные нагрузки для морфологических показателей меньше, чем для подвижности и концентрации клеток. Низкая «чувствительность» морфологических показателей сперматозоидов к токсической нагрузке согласуется с результатами исследований морфологии семенников грызунов, в которых авторы не обнаруживали структурных перестроек, обусловленных загрязнением среды [Daneek-Poprawa, Sawicka-Karusta, 2004; Мухачева, Давыдова, 2006; Давыдова, 2007].



белый круглый маркер и пунктир – *Cl. glareolus*, черный круглый маркер и сплошная линия – *Cl. rutilus*, треугольный маркер и сплошная линия – *S. uralensis*; эллипсы – 95 % ДИ
 Рисунок 7.2 – Зависимость прямолинейности движения (STR) сперматозоидов от их концентрации

Изученные морфологические показатели сперматозоидов малоинформативны для анализа действия поллютантов на грызунов из природных популяций, поэтому их нецелесообразно использовать в экотоксикологических работах (по крайней мере, при сопоставимых уровнях загрязнения). В то же время обнаруженная, хотя и слабая реакция показателей подвижности сперматозоидов на загрязнение позволяет в перспективе исследовать и другие важные функциональные характеристики для оценки их качества (например, уровень апоптоза, содержание экстра- и интраклеточных нуклеиновых кислот).

Результаты анализа главных компонент согласуются с результатами отдельно проведенных тестов для разных показателей, изложенные в предыдущих главах, и демонстрируют или отсутствие эффектов, связанных с влиянием факторов «район» и «группа», или слабость эффектов, связанных с зоной загрязнения и тяжелыми металлами (Рисунок 7.3).



квадратный маркер – предикторы, круглый маркер – зависимые переменные
 Рисунок 7.3 – Структура связей между предикторами и показателями сперматозоидов у *Cl. glareolus*

Почти все ранее цитированные авторы исследовали одновременно несколько показателей сперматозоидов. М. Kotula-Balak с соавт. (2014) показали разнонаправленное влияние ксеноэстрогенов на показатели подвижности сперматозоидов *Cl. glareolus* при двух типах содержания (длинный и короткий фотопериод), причем ксеноэстрогены увеличивали встречаемость сперматозоидов с дефектами хвоста в обоих случаях. В эксперименте с затравками сульфатом меди и хлоридом алюминия у *Cl. glareolus* в опытной группе уменьшались и доля подвижных клеток, и доля морфологически нормальных клеток [Miska-Schramm et al., 2014, 2017].

L.V. Tannenbaum с соавт. (2003) у белоногого хомячка (*Peromyscus leucopus*) возле завода боеприпасов (RVAAP) не обнаружили влияния загрязнения ни на долю подвижных сперматозоидов (она составляла 94–99 %), ни на долю аномальных клеток (они отсутствовали). В другом исследовании этих же авторов, проведенном на нескольких видах грызунов из разных районов, доля подвижных клеток животных не коррелировала с долей аномальных клеток: изменения доли

подвижных клеток на фоновых и загрязненных территориях достигали 47 %, а частота патологий клеток не превышала 0.1 % [Tannenbaum et al., 2007].

Несмотря на противоречивость опубликованных данных, комплексный анализ показателей сперматозоидов представляется важным, поскольку позволяет оценить согласованность их изменений. Так, Л.В. Осадчук и М.А. Клещев (2016) показали, что у мышей линии СВА/Лас низкое содержание сперматозоидов в обоих эпидидимисах (эпидидимальный резерв) сопровождалось увеличением их подвижности и снижением доли аномальных клеток. По мнению авторов, поддержание фертильности самцов на оптимальном уровне может обеспечиваться компенсаторным увеличением качества сперматозоидов.

В нашей работе только у одного вида, *Cl. glareolus*, была обнаружена согласованность реакции на загрязнение: одновременное увеличение доли аномальных клеток, уменьшение доли подвижных клеток и их скорости (например, VCL ниже в среднем на 9.0 мкм/с (95 % ДИ: 1.6–16.3) [Смирнов и др., 2022] на импактных участках, а также уменьшение подвижности сперматозоидов с увеличением концентрации токсичных элементов (Cd, Pb) в организме. Однако, несмотря на статистическую значимость, все обнаруженные эффекты оказались слабыми, например, фактор «зона загрязнения» объяснял только 8 % дисперсии для VCL.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У модельных видов грызунов (*Cl. glareolus*, *Cl. rutilus*, *S. uralensis*), обитающих на участках с контрастными (фоновым и импактным) уровнями химического загрязнения от промышленных выбросов в районах двух медеплавильных заводов, исследованы морфологические показатели (размеры и встречаемость аномалий), подвижность и концентрация эпидидимальных сперматозоидов.

В ходе работы были оценены:

- уровни меж- и внутривидовой (популяционной и индивидуальной) изменчивости морфометрических показателей нормальных сперматозоидов;
- уровни онтогенетической изменчивости морфологии, подвижности и концентрации сперматозоидов, связанной с бивариантным развитием грызунов;
- уровни изменчивости морфологии сперматозоидов, связанной со стадиями полового развития;
- концентрации эссенциальных (Cu и Zn) и токсичных (Cd и Pb) элементов в печени грызунов как показатели индивидуальной токсической нагрузки на организм.

Основные усилия были сосредоточены на анализе:

- влияния загрязнения на качество сперматозоидов;
- структуры связей между предикторами (район, зона загрязнения, концентрации тяжелых металлов, вид, популяционная группа) и комплексом показателей сперматозоидов.

Значительную часть работы составил поиск и апробация новых или верификация существующих методов исследования эпидидимальных сперматозоидов грызунов. Это связано с отсутствием унифицированных методов для наших объектов, сложностью отбора сперматозоидов у млекопитающих с небольшими размерами половых желез, а также разнообразием исследовательских задач. В ряде случаев опубликованные протоколы оказались неполными, поэтому в диссертации максимально подробно изложены нюансы

использованных нами методов и обращено внимание на возможные «подводные камни».

Мы предложили оригинальный метод, позволяющий отбирать сперматозоиды одновременно для анализа морфологии, подвижности и концентрации, а также модифицированную питательную среду, позволяющую сохранять жизнеспособность половых клеток в течение длительного времени без снижения характеристик движения. Мы также существенно продвинулись в опыте использования автоматического анализа сперматозоидов (CASA) и выявили ряд проблем, которые необходимо решить в будущем (в частности, проблему выбора порогов для дифференциации субпопуляций клеток).

Фрагменты работы, касающиеся показателей нормальных сперматозоидов грызунов, их индивидуальной, популяционной и межвидовой изменчивости, не связаны непосредственно с оценкой влияния загрязнения на качество сперматозоидов. Тем не менее, они необходимы, поскольку позволили получить представление о базовых характеристиках исследуемых объектов. Также они важны для интерпретации результатов с точки зрения современных экологических и эволюционных концепций.

Перспективным представляется изучение изменчивости, связанной со стадиями полового развития (созреванием, зрелостью, угасанием половой функции), поскольку у сеголеток с инволюцией половых желез обнаружена более высокая частота встречаемости дефектов головки по сравнению с перезимовавшими особями. Это свидетельствует о том, что эффекты блокировки репродуктивной функции намного сильнее эффектов, связанных с календарным возрастом животных. Пока этот вариант изменчивости исследован только для морфологических показателей сперматозоидов. Несомненна перспективность такого анализа и для других показателей сперматозоидов – подвижности и концентрации.

Несмотря на статистическую значимость, обнаруженные токсические эффекты оказались слабыми. Фактически ни один из исследованных показателей сперматозоидов сам по себе не может быть надежным маркером промышленного

загрязнения, по крайней мере, для исследуемых уровней загрязнения металлами. При этом показатели подвижности сперматозоидов оказались более чувствительными к загрязнению по сравнению с морфологическими показателями, что согласуется с представлениями о консервативности клеточных структур. Кроме того, одинаковая частота встречаемости аномальных клеток у разных видов и популяционных групп может свидетельствовать о естественной обусловленности таких фоновых уровней этого показателя.

Тем не менее, обнаруженная на индивидуальном уровне статистически значимая отрицательная зависимость между концентрациями токсичных металлов в организме и подвижностью сперматозоидов может косвенно свидетельствовать о каузальном характере даже слабых токсических эффектов. Кроме того, на импактных участках показатели и морфологии (доля аномальных клеток), и подвижности изменялись однонаправленно – в сторону ухудшения качества сперматозоидов. Такая согласованность реакции на химическое загрязнение может приводить к суммации многих слабых эффектов, что делает «итоговый популяционный» эффект не столь слабым.

Важно отметить, что вклад фактора «район» в изменчивость показателей в большинстве тестов был несущественным. Это может свидетельствовать о сходстве воздействия двух источников загрязнения и выявлении закономерностей, которые не связаны со спецификой выбросов конкретного предприятия.

Слабые эффекты загрязнения можно объяснить наличием гомеостатических барьеров, в первую очередь гематотестикулярного, надежно защищающих репродуктивную функцию животных. К причинам слабых эффектов можно также отнести пространственную мозаичность токсической нагрузки, подвижность грызунов, которая позволяет избегать неблагоприятных местообитаний. Кроме того, нельзя исключить, что исследованный уровень загрязнения был недостаточен для существенного сдвига репродуктивных показателей. Это обуславливает необходимость верификации выводов для воздействия других источников промышленного загрязнения.

Большинство показателей сперматозоидов грызунов оказались видоспецифичны, даже при рассмотрении близкородственных *Cl. glareolus* и *Cl. rutilus*. По-видимому, это отражает различные репродуктивные стратегии видов. Видоспецифичной оказалась и реакция сперматозоидов на химическое загрязнение. Наиболее ярко токсические эффекты проявились у *Cl. glareolus*. К сожалению, пока мы не можем исключить, что менее выраженные эффекты (или их отсутствие) у *Cl. rutilus* и *S. uralensis* могут быть обусловлены небольшими размерами выборок для этих видов. Тем не менее, крайне низкие концентрации металлов у *S. uralensis* на импактных участках коррелируют с отсутствием токсических эффектов. В свою очередь, низкая токсическая нагрузка на организм *S. uralensis* может быть обусловлена особенностями биологии этого вида: высокой миграционной подвижностью, преимущественным питанием семенами, максимально защищенными от аккумуляции металлов и др. Видоспецифичность реакции на загрязнение свидетельствует о рискованности экстраполяции результатов с одного вида на другой и важности включения в экотоксикологические исследования разных видов.

Таким образом, проверяемые гипотезы подтвердились лишь частично:

- 1) химическое загрязнение ухудшает показатели сперматозоидов грызунов из природных популяций, однако реакция на загрязнение оказалась слабой;
- 2) реакция сперматозоидов на химическое загрязнение видоспецифична;
- 3) реакция сперматозоидов на химическое загрязнение не зависит от варианта онтогенеза.

ВЫВОДЫ

1. Показатели морфологии, подвижности и концентрации эпидидимальных сперматозоидов трех видов грызунов бореальной зоны (*Clethrionomys glareolus*, *Cl. rutilus*, *Sylvaemus uralensis*) не зависят от варианта онтогенеза и достигают дефинитивных значений у половозрелых сеголеток и перезимовавших особей; следовательно, потенциальный вклад самцов этих групп в воспроизводство популяции можно считать равноценным.

2. Химическое загрязнение, в том числе на индивидуальном уровне, слабо влияет на качество эпидидимальных сперматозоидов трех модельных видов грызунов, что может быть связано с наличием эффективных гомеостатических барьеров, в первую очередь гематотестикулярного. Изученные показатели сперматозоидов нельзя считать надежными маркерами химического загрязнения.

3. Показатели подвижности эпидидимальных сперматозоидов грызунов более чувствительны к химическому загрязнению по сравнению с морфологическими параметрами, что согласуется с представлениями о консервативности клеточных структур. Одинаково низкая частота аномальных сперматозоидов в разных популяционных группах может свидетельствовать о естественно обусловленном фоновом уровне этого показателя.

4. Реакция показателей сперматозоидов исследованных видов на химическое загрязнение видоспецифична: полевки сильнее реагируют на загрязнение по сравнению с малой лесной мышью; выраженность эффектов уменьшается в ряду *Cl. glareolus* > *Cl. rutilus* > *S. uralensis*. Устойчивость малой лесной мыши к загрязнению может быть обусловлена особенностями ее биологии, в частности большей подвижностью и преимущественным питанием семенами.

5. У *Cl. glareolus*, наиболее чувствительного к химическому загрязнению из изученных видов, морфологические показатели и подвижность сперматозоидов с увеличением токсической нагрузки изменяются однонаправленно (ухудшаются), что свидетельствует о согласованной реакции половых клеток на загрязнение.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамсон Н.И. Семейство Хомяковые / Family Cricetidae / Н.И. Абрамсон, А.А. Лисовский // Млекопитающие России: систематико-географический справочник: Сборник трудов Зоологического музея МГУ. – Москва: КМК, 2012. – Т. 52. – С. 210–276.
2. Абрамсон Н.И. Современная и историческая интрогрессия митохондриальной ДНК между красной (*Clethrionomys rutilus*) и рыжей (*Clethrionomys glareolus*) полевками (Rodentia, Cricetidae) / Н.И. Абрамсон, Е.Н. Родченкова, М.В. Фокин, и др. // Доклады Академии наук. – 2009. – Т. 425. – С. 415–418.
3. Аксенова Т.Г. Особенности строения сперматозоидов и их значение в систематике серых полевок (Rodentia, *Microtus*) / Т.Г. Аксенова // Труды Зоологического института АН СССР. – 1978. – Т. 79. – С. 91–101.
4. Аксенова Т.Г. Строение головок сперматозоидов у некоторых видов серых полёвок рода *Microtus* (Rodentia, Cricetidae) / Т.Г. Аксенова // Зоологический журнал. – 1973. – Т. 52. – № 4. – С. 625–629.
5. Алоян К.А. Физиологические механизмы обеспечения подвижности сперматозоидов / К.А. Алоян, А.В. Матвеев, В.В. Морев, и др. // Урологические ведомости. – 2013. – Т. 3. – № 4. – С. 14–19.
6. Амбарян А.В. Взаимосвязь характеристик полового поведения и показателей конкурентоспособности спермы самцов у таксонов надвидового комплекса *Mus musculus sensu lato* / А.В. Амбарян, А.Н. Мальцев, Е.В. Котенкова // Журнал общей биологии. – 2015. – Т. 76. – № 3. – С. 212–224.
7. Амстиславский С.Я. Крриоконсервация эпидидимального семени хомячков джунгарского (*Phodopus sungorus*) и Кэмпбелла (*Phodopus campbelli*, Cricetinae) / С.Я. Амстиславский, Е.А. Кизилова, Е.Ю. Брусенцев, и др. // Зоологический журнал. – 2016. – Т. 95. – № 5. – С. 604–613.
8. Атопкин Д.М. Молекулярная филогенетика и филогеография лесных мышей рода *Sylvaemus* по данным частичного секвенирования гена цитохрома b

митохондриальной ДНК / Д.М. Атопкин, Г.Н. Челомина, А.С. Богданов // Териофауна России и сопредельных территорий (VIII съезд Териологического общества), 31 января – 2 февраля 2007 г., Москва. – Москва: Т-во научн. изданий КМК, 2007. – С. 26.

9. Балакирев А.Е. К вопросу о таксономическом статусе формы *ciscaucasicus* и ее родственных отношениях с малой лесной мышью *Sylvaemus uralensis* по данным секвенирования гена цитохрома b мтДНК / А.Е. Балакирев, М.И. Баскевич, А.П. Гмыль, и др. // Генетика. – 2007. – Т. 43. – № 12. – С. 1651–1666.

10. Баскевич М.И. Диагностика мышей рода *Apodemus* (Rodentia, Muridae) из западной части Большого Кавказа в условиях симбиотопии / М.И. Баскевич, С.Г. Потапов, Н.М. Окулова, и др. // Зоологический журнал. – 2004а. – Т. 83. – № 10. – С. 1261–1269.

11. Баскевич М.И. Сравнительный анализ сперматозоидов шести видов мышей рода *Apodemus* (Rodentia, Muridae) из Восточной Европы и Закавказья / М.И. Баскевич, С.Г. Потапов, Н.М. Окулова, и др. // Зоологический журнал. – 2004б. – Т. 83. – № 6. – С. 725–732.

12. Баскевич М.И. Сравнительный анализ особенностей сперматозоидов и кариотипов у трех видов кустарниковых полевок: *Terricola majori*, *T. daghestanicus*, *T. subterraneus* (Rodentia, Cricetidae) с территории бывшего СССР / М.И. Баскевич // Зоол. журн. – 1997. – Т. 76. – № 5. – С. 597–607.

13. Безель В.С. Экологическая токсикология / В.С. Безель, Е.А. Бельский, Д.В. Веселкин, и др. publisher: Уральский государственный университет Уральский государственный университет – Екатеринбург: УрГУ им. А.М. Горького, 2001. – 136 с.

14. Безель В.С. Популяционная экотоксикология / В.С. Безель, В.Н. Большаков, Е.Л. Воробейчик. – М.: Наука, 1994. – 80 с.

15. Безель В.С. Элементный состав рационов питания и тканей мелких млекопитающих различных трофических уровней как биоиндикатор химического загрязнения окружающей среды / В.С. Безель, К.П. Куценогий, С.В. Мухачева, и др. // Химия в интересах устойчивого развития. – 2007. – Т. 15. – № 1. – С. 33–42.

16. Безель В.С. Геохимическая экология мелких млекопитающих в условиях промышленного загрязнения среды: есть ли эффект от снижения выбросов? / В.С. Безель, С.В. Мухачева // Геохимия. – 2020. – Т. 65. – № 8. – С. 823–832.
17. Безель В.С. Экологическая токсикология: популяционный и биоценотический аспекты / В.С. Безель. – Екатеринбург: Гощицкий, 2006. – 280 с.
18. Бердюгин К.И. Млекопитающие Полярного Урала / К.И. Бердюгин, В.Н. Большаков, В.С. Балахонов, и др. publisher: Уральский государственный университет Уральский государственный университет – Екатеринбург: Издательство Уральского университета, 2007. – 384 с.
19. Бернштейн А.Д. Сравнительная эколого-эпизоотологическая характеристика лесных полевок (*Clethrionomys*) Среднего Предуралья / А.Д. Бернштейн, Н.С. Апекина, Л.Ф. Копылова, и др. // Зоол. журн. – 1987. – Т. 66. – № 9. – С. 1397–1407.
20. Богданов А.С. Анализ генетической изменчивости и дифференциации малой лесной мыши *Sylvaemus uralensis* (Rodentia, Muridae) методом RAPD-PCR / А.С. Богданов, Д.М. Атопкин, Г.Н. Челомина // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2009. – № 3. – С. 276–292.
21. Боков Д.А. Интерстициальный эндокринный аппарат семенников экспериментальных животных в условиях хром-бензолной интоксикации / Д.А. Боков, Е.В. Ермолина, М.В. Семенова, и др. // Гигиена и санитария. – 2014. – Т. 93. – № 4. – С. 100–104.
22. Большаков В.Н. Млекопитающие Свердловской области. Справочник-определитель / В.Н. Большаков, К.И. Бердюгин, И.А. Васильева, и др.; ред. А.Г. Васильев publisher: Издательство «Екатеринбург». – Екатеринбург: Екатеринбург, 2000. – 240 с.
23. Бородин А.В. Природный гибрид красной (*Clethrionomys rutilus*) и рыжей (*Clethrionomys glareolus*) полевок (Rodentia, Arvicolinae) на Среднем Урале / А.В. Бородин, Ю.А. Давыдова, М.А. Фоминых // Зоологический журнал. – 2011. – Т. 90. – № 5. – С. 634–640.

24. Бородин А.В. История полевок рода *Clethrionomys* Западно-Сибирской низменности / А.В. Бородин // Современное состояние и история животного мира Западно-Сибирской низменности. – Свердловск, 1988. – С. 21–31.
25. Воробейчик Е.Л. Исследование мелких млекопитающих Висимского заповедника: вклад в популяционную экотоксикологию? / Е.Л. Воробейчик, Ю.А. Давыдова, С.Ю. Кайгородова, и др. // Результаты изучения природы Висимского биосферного заповедника: Науч. сб. ИЭРиЖ УрОРАН. Екатеринбург. – 2006. – С. 108–129.
26. Воробейчик Е.Л. Начальные этапы восстановления сообществ почвенной мезофауны после сокращения выбросов медеплавильного завода / Е.Л. Воробейчик, А.И. Ермаков, М.Е. Гребенников // Экология. – 2019. – № 2. – С. 133–148.
27. Воробейчик Е.Л. Естественное восстановление наземных экосистем после прекращения промышленного загрязнения. 1. Обзор современного состояния исследований / Е.Л. Воробейчик // Экология. – 2022. – № 1. – С. 3–41.
28. Воробейчик Е.Л. Многолетняя динамика содержания тяжелых металлов в верхних горизонтах почв в районе воздействия медеплавильного завода в период сокращения объемов его выбросов / Е.Л. Воробейчик, С.Ю. Кайгородова // Почвоведение. – 2017. – № 8. – С. 1009–1024.
29. Воробейчик Е.Л. Промышленное загрязнение снижает роль деревьев в формировании структуры полей концентраций тяжелых металлов в лесной подстилке / Е.Л. Воробейчик, П.Г. Пищулин // Экология. – 2016. – № 5. – С. 323–334.
30. Воробейчик Е.Л. Многолетняя динамика лесной растительности в период сокращения выбросов медеплавильного завода / Е.Л. Воробейчик, М.Р. Трубина, Е.В. Хантемирова, и др. // экология. – 2014. – № 6. – С. 448–448.
31. Гагарская Н.К. Экологический мониторинг элементного состава лесной растительности и морфофункционального состояния мелких млекопитающих в посттехногенных экосистемах / Н.К. Гагарская, Е.Н. Чернова // Биоразнообразие,

проблемы экологии Горного Алтая и сопредельных регионов: настоящее, прошлое, будущее. – Горно-Алтайск, 2010. – С. 160–163.

32. Гольдштейн Б.И. Тиоловые группы тканевых белков, их химические свойства и биологическое значение / Б.И. Гольдштейн // Тиоловые соединения в медицине. – Киев: Госмедизд УССР, 1959. – С. 49–52.

33. Государственные доклады о состоянии и об охране окружающей среды Свердловской области (Государственные доклады о состоянии и об охране окружающей среды Свердловской области), 1995–2020 гг. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://ipae.uran.ru/library/publications_pdf/gos_doklady (дата обращения: 03.03.2022).

34. Григоркина Е.Б. Миграции грызунов в зоне локального радиоактивного загрязнения на разных фазах динамики численности и их следствия / Е.Б. Григоркина, Г.В. Оленев // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2018. – № 1. – С. 123–132.

35. Громов В.С. Забота о потомстве и секреция тестостерона у самцов лесных грызунов: Сенситизация и андрогенная стимуляция родительского поведения / В.С. Громов, Л.В. Осадчук // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2015. – № 4. – С. 423–430.

36. Гурьевских О.Ю. Физико-географическое районирование и ландшафты Свердловской области / О.Ю. Гурьевских, В.Г. Капустин, Н.В. Скок, и др. – Екатеринбург: Уральский государственный педагогический университет, 2016. – 280 с.

37. Давыдова Ю.А. Микроструктура семенников рыжей полевки в условиях хронического химического загрязнения среды: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 16.00.02 / Ю.А. Давыдова. – Екатеринбург: Уральская гос. сельхоз. академия, 2007. – 24 с.

38. Давыдова Ю.А. Промышленное загрязнение не увеличивает частоту нефропатологий у рыжей полевки / Ю.А. Давыдова, С.В. Мухачева // Экология. – 2014. – № 4. – С. 278–278.

39. Давыдова Ю.А. Морфометрические признаки сперматозоидов рыжей полевки, красной полевки и малой лесной мыши / Ю.А. Давыдова, С.В. Мухачева, Г.Ю. Смирнов // Вестник ИрГСХА. – 2017а. – № 83. – С. 37–41.
40. Давыдова Ю.А. Морфометрические признаки сперматозоидов рыжей полевки, обитающей в окрестностях медеплавильного завода / Ю.А. Давыдова, С.В. Мухачева, Г.Ю. Смирнов // Известия Российской Военно-медицинской академии. – 2017б. – Т. 36. – № 2 (S 1). – С. 10–11.
41. Давыдова Ю.А. Изменение массы семенников мышевидных грызунов, обитающих в условиях химического и радиоактивного загрязнения / Ю.А. Давыдова, С.В. Мухачева, М.В. Чибиряк // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2009. – № 2. – С. 136–137.
42. Дмитриев С.Г. Сравнительный анализ сперматозоидов у шести видов лесных полевок рода *Clethrionomys* (Rodentia) / С.Г. Дмитриев, М.И. Баскевич, В.М. Малыгин // Зоологический журнал. – 1991. – Т. 70. – № 9. – С. 118–124.
43. Дрейпер Н. Прикладной регрессионный анализ / Н. Дрейпер, Г. Смит. – 3 издание. – М.: Диалектика, 2017. – 912 с.
44. Дуденкова Н.А. Изменения морфофункционального состояния и продуктивности семенных желез белых крыс при воздействии ацетата свинца / Н.А. Дуденкова, О.С. Шубина // Фундаментальные исследования. – 2013. – Т. 6. – № 10. – С. 1253–1259.
45. Европейская рыжая полевка / ред. Н.В. Башенина. – М.: Наука, 1981. – 351 с.
46. Ершов Ю.А. Механизмы токсического действия неорганических соединений / Ю.А. Ершов, Т.В. Плетенева. – Медицина, 1989. – 272 с.
47. Иванкина Е.В. Динамика численности и структура населения рыжей полевки в Подмосковье: Автореф. дис. ... канд. биол. наук / Е.В. Иванкина. – Москва: М, 1987. – 23 с.
48. Ивантер Э.В. Экологическая токсикология природных популяций птиц и млекопитающих Севера / Э.В. Ивантер, Н.В. Медведев. – М.: Наука, 2007. – 229 с.
49. Карамышева Т.В. Сравнительный FISH-анализ С-позитивных блоков прицентромерных районов хромосом малых лесных мышей *Sylviaemus uralensis*

(Rodentia, Muridae) / Т.В. Карамышева, А.С. Богданов, И.В. Картавцева, и др. // Генетика. – 2010. – Т. 46. – № 6. – С. 805–816.

50. Карасева Е.В. Методы изучения грызунов в полевых условиях / Е.В. Карасева, А.Ю. Телицина. – М.: Наука, 1996. – 227 с.

51. Кизилова Е.А. Морфологический анализ интактного эпидидимального семени грызунов / Е.А. Кизилова, Т.О. Абрамова, Е.Ю. Брусенцев, и др. // Современные проблемы анатомии, гистологии и эмбриологии животных. – Казань, 2015. – С. 39–46.

52. Киселева Ю.Ю. Увеличение анеуплоидий эмбрионов ассоциировано с пониженной долей морфологически нормальных сперматозоидов / Ю.Ю. Киселева, М.М. Азова, Т.А. Кодылева, и др. // Генетика. – 2017. – Т. 53. – № 12. – С. 1458–1462.

53. Колчева Н.Е. Динамика экологической структуры популяций лесной мыши на Южном Урале: дис. канд. биол. наук: 03.00.16 / Н.Е. Колчева. – Екатеринбург, 1992. – 179 с.

54. Кошкина Т.В. Сравнительная экология рыжих полевок в северной тайге / Т.В. Кошкина // Фауна и экология грызунов: 5. – М.: МГУ, 1957. – С. 3–65.

55. Кудяшева А.Г. Биологические эффекты радиоактивного загрязнения в популяциях мышевидных грызунов / А.Г. Кудяшева, Л.Н. Шишкина, О.Г. Шевченко, и др. publisher: УрО РАН. – Екатеринбург: Коми научн. цент УрО РАН, 2004. – 214 с.

56. Курляндский Б.А. Общая токсикология / Б.А. Курляндский, В.А. Филлов, В.С. Безель, и др. – Открытое акционерное общество Издательство Медицина, 2002. – 607 с.

57. Кшнясев И.А. Динамика плотности и структуры популяций лесных полевок в южной тайге / И.А. Кшнясев, Ю.А. Давыдова // Вестник Нижегородского университета им. Н. И. Лобачевского. Серия: Биология. – 2005. – № 1(9). – С. 113–123.

58. Кшнясев И.А. Популяционные циклы и синдром Читти / И.А. Кшнясев, Ю.А. Давыдова // Экология. – 2021. – № 1. – С. 51–57.

59. Лукьянец А.И. Состояние загазованных лесов в районе городов Верхнего Тагила и Кировграда / А.И. Лукьянец // Популяционные и биогеоценологические исследования в горных темнохвойных лесах Среднего Урала. – 1979. – С. 147–165.
60. Лукьянец А.И. Влияние загрязнения атмосферы дымогазовыми эмиссиями на леса, прилежащие с востока к Висимскому заповеднику / А.И. Лукьянец, Т.А. Шелковникова // Информационные материалы Среднеуральского биогеоценологического стационара. – 1975. – С. 29–32.
61. Лукьянов О.А. Динамика показателей обилия и пространственной структуры населения рыжей полевки на фоновой и техногенных территориях / О.А. Лукьянов, Л.Е. Лукьянова // Млекопитающие в экосистемах. – Свердловск, 1990. – С. 37–39.
62. Лукьянова Л.Е. Реакция сообществ и популяций мелких млекопитающих на техногенные воздействия. 1. Сообщества / Л.Е. Лукьянова, О.А. Лукьянов // Успехи современной биологии. – 1998а. – Т. 118. – № 5. – С. 613–622.
63. Лукьянова Л.Е. Реакция сообществ и популяций мелких млекопитающих на техногенные воздействия. 2. Популяции / Л.Е. Лукьянова, О.А. Лукьянов // Успехи современной биологии. – 1998б. – Т. 118. – № 5. – С. 693–706.
64. Лукьянова Л.Е. Население малой лесной мыши (*Apodemus uralensis*) в условиях естественно нарушенной среды обитания на охраняемой территории Среднего Урала / Л.Е. Лукьянова // Вестник Сыктывкарского университета. Серия 2: Биология. Геология. Химия. Экология. – 2021. – № 3(19). – С. 37–48.
65. Лукьянова Л.Е. Население обыкновенной бурозубки (*Sorex araneus*, Eulipotyphla) и кормообеспеченность ее местообитаний в экологически контрастной среде / Л.Е. Лукьянова, Н.Л. Ухова, О.В. Ухова, и др. // Экология. – 2021. – № 4. – С. 298–311.
66. Макутина В.А. Экспериментальная оценка сочетанного действия психогенного стресса и металлов (на примере алюминия и кадмия) на репродуктивную систему самцов лабораторных крыс: автореф. дис. ... канд. биол. наук: 14.02.04 / В.А. Макутина. – Москва: ФГБУ «Научно-исследовательском институте медицины труда» РАМН, 2013. – 23 с.

67. Мальцев А.Н. Оценка фертильности экологически различающихся форм домовых мышей и их гибридов надвидового комплекса *Mus musculus sensu lato* (Rodentia: Muridae) / А.Н. Мальцев, А.В. Амбарян, Е.В. Котенкова // Поволжский экологический журнал. – 2016. – № 3. – С. 280–291.
68. Мамина В.П. Анализ адаптационных возможностей репродуктивной системы рыжей полевки *Myodes glareolus*, обитающей на территориях природных геохимических аномалий / В.П. Мамина, Е.А. Малкова // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2021. – № 6. – С. 660–672.
69. Мамина В.П. Морфофункциональный анализ семенников и сперматозоидов в оценке репродуктивного успеха самцов рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) / В.П. Мамина // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2012. – № 5. – С. 554–562.
70. Марин Ю.Ф. К организации экологического мониторинга в районе Висимского заповедника / Ю.Ф. Марин // Исследования природы в заповедниках Урала. Инф. материалы. – Свердловск, 1990. – С. 43–46.
71. Марин Ю.Ф. О влиянии Кировградского медькомбината на природу / Ю.Ф. Марин // Проблемы заповедного дела. 25 лет Висимскому заповеднику: Матер. конф. – Екатеринбург: Екатеринбург, 1996. – Т. 25. – С. 87–91.
72. Марин Ю.Ф. Проект программы работ по экологическому мониторингу загрязнения территории Висимского заповедника / Ю.Ф. Марин // Исследования природы в заповедниках Урала. Инф. материалы. – Свердловск, 1992. – С. 23–26.
73. Межжерин С.В. Генетическая дифференциация и филогенетические связи мышей Палеарктики (Rodentia, Muridae) / С.В. Межжерин // Генетика. – 1997а. – Т. 33. – № 1. – С. 78–86.
74. Межжерин С.В. Систематическая ревизия мышей рода *Apodemus* Каур, 1829 (Rodentia, Muridae) / С.В. Межжерин // Вестник зоологии. – 1997b. – № 4. – С. 29–41.
75. Михайлова И.Н. Динамика сообществ эпифитных лишайников в начальный период после снижения выбросов медеплавильного завода / И.Н. Михайлова // Экология. – 2020. – № 1. – С. 43–50.

76. Михеева Е.В. Адаптация европейской рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus* Schreber) к условиям природной биогеохимической провинции с избыточным содержанием никеля, кобальта и хрома / Е.В. Михеева, О.А. Жигальский, В.П. Мамина, и др. // Журнал общей биологии. – 2006. – Т. 67. – № 3. – С. 212–222.
77. Мохаммадзаде С. Переживание сперматозоидов в половых путях мышей *post mortem* / С. Мохаммадзаде, Г.Ю. Максудов, Ю.К. Доронин // Доклады Академии наук. – Федеральное государственное бюджетное учреждение " Российская академия наук", 2011. – Т. 436. – С. 270–272.
78. Мухачева С.В. Уровни токсических элементов и функциональная структура популяций мелких млекопитающих в условиях техногенного загрязнения (на примере рыжей полевки) / С.В. Мухачева, В.С. Безель // Экология. – 1995. – № 3. – С. 237–240.
79. Мухачева С.В. Воспроизводство населения рыжей полевки в градиенте техногенного загрязнения среды / С.В. Мухачева // Зоол. журнал. – 2001. – Т. 80. – № 12. – С. 1509–1517.
80. Мухачева С.В. Накопление тяжелых металлов в репродуктивных органах самцов рыжей полевки, обитающих в градиенте токсической нагрузки / С.В. Мухачева, Ю.А. Давыдова // Ученые записки НТГСПА. Естественные науки. – Н. Тагил: НТГСПА, 2009. – С. 172–178.
81. Мухачева С.В. Состояние семенников рыжей полевки в условиях химического загрязнения среды обитания / С.В. Мухачева, Ю.А. Давыдова // Успехи современного естествознания. – 2006. – № 2. – С. 65–66.
82. Мухачева С.В. Многолетняя динамика концентрации тяжелых металлов в корме и организме рыжей полевки (*Myodes glareolus*) в период снижения выбросов медеплавильного завода / С.В. Мухачева // Экология. – 2017. – № 6. – С. 461–471.
83. Мухачева С.В. Многолетняя динамика показателей репродукции рыжей полевки в период сокращения промышленных выбросов / С.В. Мухачева // Принципы экологии. – 2016. – № 3. – С. 102–102.

84. Мухачева С.В. Многолетняя динамика сообществ мелких млекопитающих в период снижения выбросов медеплавильного завода. I. Состав, обилие и разнообразие / С.В. Мухачева // Экология. – 2021. – № 1. – С. 66–76.
85. Мухачева С.В. Многолетняя динамика сообществ мелких млекопитающих в период снижения выбросов медеплавильного завода. II. Бета-разнообразие / С.В. Мухачева, А.Н. Созонтов // Экология. – 2021. – № 6. – С. 470–480.
86. Нестеркова Д.В. Морфофизиологические показатели трех видов мелких млекопитающих в окрестностях медеплавильного комбината / Д.В. Нестеркова, Ю.А. Давыдова, С.В. Мухачева // Биологические системы: устойчивость, принципы и механизмы функционирования. – 2012. – С. 90–92.
87. Новиков Е.А. Влияние типа онтогенеза на биоэнергетические показатели красной полевки (*Myodes rutilus* Pall) из горно-таежной популяции юга Западной Сибири / Е.А. Новиков, Е.Ю. Кондратюк, Д.В. Петровский // Экология. – 2015. – № 5. – С. 387–391.
88. Новиков Е.А. Роль стресса в модификации онтогенетических программ / Е.А. Новиков, М.П. Мошкин // Успехи современной биологии. – 2009. – Т. 129. – № 3. – С. 227–238.
89. Окулова Н.М. Род *Clethrionomys* Tilesius, 1850—рыжие или лесные полевки / Н.М. Окулова, Ю.А. Мясников // Медицинская териология. М.: Наука. – 1979. – С. 158–165.
90. Оленев Г.В. Альтернативные типы онтогенеза цикломорфных грызунов и их роль в популяционной динамике (экологический анализ) / Г.В. Оленев // Экология. – 2002. – № 5. – С. 341–350.
91. Оленев Г.В. Эволюционно-экологический анализ стратегий адаптации популяций грызунов в экстремальных условиях / Г.В. Оленев, Е.Б. Григоркина // Экология. – 2016. – № 5. – С. 375–381.
92. Оленев Г.В. Динамика генерационной структуры популяции рыжей полевки в период спада и восстановления численности / Г.В. Оленев // Популяционные механизмы динамики численности животных: Тр. Ин-та экологии растений и животных УНЦ АН СССР. – 1979. – Вып. 126. – С. 23–32.

93. Оленев Г.В. Определение возраста цикломорфных грызунов, функционально-онтогенетическая детерминированность, экологические аспекты / Г.В. Оленев // Экология. – 2009. – № 2. – С. 103–115.
94. Оленев Г.В. Популяционные механизмы приспособлений к экстремальным факторам среды (на примере рыжей полевки) / Г.В. Оленев // Журнал общей биологии. – 1981. – Т. 42. – № 4. – С. 506–511.
95. Оленев Г.В. Функциональная детерминированность онтогенетических изменений возрастных маркеров грызунов и их практическое использование в популяционных исследованиях / Г.В. Оленев // Экология. – 1989. – № 2. – С. 19–31.
96. Осадчук Л.В. Межлинейные различия показателей сперматогенеза у инбредных мышей / Л.В. Осадчук, М.А. Клещев // Морфология. – 2016. – Т. 149. – № 2. – С. 54–57.
97. Осадчук Л.В. Генетическая изменчивость продукции и морфологии сперматозоидов у лабораторных мышей / Л.В. Осадчук, А.В. Осадчук // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 149. – № 6. – С. 678–681.
98. Осадчук Л.В. Фенотипическая вариабельность сперматогенеза и поиск ассоциаций с генным полиморфизмом у мышей 13 инбредных линий / Л.В. Осадчук, А.Е. Тупикин, И.В. Морозов, и др. // Генетика. – 2012. – Т. 48. – № 8. – С. 966–975.
99. Осипов Ю.С. Большая российская энциклопедия [Электронный ресурс] / Ю.С. Осипов. – Режим доступа: <https://bigenc.ru/biology/text/4247119> (дата обращения: 03.06.2022).
100. Осипова О.В. Гибридизация рыжих и красных полевок в экспериментальных условиях / О.В. Осипова, А.А. Соктин // Доклады Академии наук. – Федеральное государственное унитарное предприятие Академический научно-издательский, производственно-полиграфический и книгораспространительский центр Наука, 2006. – Т. 410. – С. 139–141.
101. Осипова О.В. Моделирование процесса древней гибридизации рыжих и красных полевок в эксперименте / О.В. Осипова, А.А. Соктин // Доклады Академии наук. – Федеральное государственное унитарное предприятие Академический

И.А. Кшнясев // «Млекопитающие в меняющемся мире: актуальные проблемы териологии» (XI Съезд Териологического общества при РАН). Материалы конференции с международным участием, 14–18 марта 2022 г., г. Москва, ИПЭЭ РАН. – Москва: Тов-во научных изданий КМК, 2022. – С. 326.

112. Смирнов Г.Ю. Онтогенетические изменения морфологии сперматозоидов рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) / Г.Ю. Смирнов, Ю.А. Давыдова // Экология. – 2020. – № 2. – С. 156–159.

113. Смирнов Г.Ю. Качественная оценка морфологии сперматозоидов рыжей полевки *Myodes glareolus* Schreber в условиях промышленного загрязнения / Г.Ю. Смирнов // Экология: факты, гипотезы, модели: Материалы конф. молодых ученых, 27–31 марта 2017 г. – Екатеринбург: ИД «Лисица», 2017. – С. 119.

114. Смирнов Г.Ю. Определение параметров подвижности сперматозоидов грызунов из природных популяций с использованием автоматического анализатора / Г.Ю. Смирнов // Молодежь и наука на Севере: Материалы докладов III Всероссийской (XVIII) молодежной научной конференции, 12-14 марта 2018 г. – Сыктывкар: ФГБУН ФИЦ «Коми научный центр Уральского отделения Российской академии наук», 2018. – Т. 1. – С. 124–125.

115. Смирнов Г.Ю. Подвижность сперматозоидов рыжей (*Clethrionomys glareolus*) и красной (*Cl. rutilus*) полевок в условиях промышленного загрязнения / Г.Ю. Смирнов // Экология. – 2022. – № 1. – С. 74–84.

116. Сморкалов И.А. Новая методика определения интенсивности дыхания лесной подстилки в полевых условиях / И.А. Сморкалов // Экология. – 2016. – № 5. – С. 390–395.

117. Соколов В.Е. Определитель млекопитающих Монгольской Народной Республики / В.Е. Соколов, В.Н. Орлов. – Москва: Наука, 1980. – 350 с.

118. Справочник по гидрохимии [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://web.archive.org/web/20100430095527/http://biology.krc.karelia.ru/misc/hydro/index.html> (дата обращения: 15.03.2022).

119. Стахеев В.В. Уточнение видового состава лесных мышей рода *Sylvaemus* на территории Ростовской области посредством кариологического, аллозимного и

молекулярно-генетического анализ / В.В. Стахеев, А.С. Богданов, Д.И. Водолажский // Генетика. – 2011. – Т. 47. – № 5. – С. 660–670.

120. Тарахтий Э.А. Сезонная изменчивость показателей системы крови рыжей полевки (*Clethrionomys glareolus*) разного репродуктивного состояния / Э.А. Тарахтий, Ю.А. Давыдова // Известия Российской академии наук. Серия биологическая. – 2007. – № 1. – С. 14–25.

121. Тестов Б.В. Влияние радиоактивного загрязнения на популяции мышевидных грызунов: автореф. дис. ... докт. биол. наук / Б.В. Тестов. – Екатеринбург, 1993. – 35 с.

122. Трахтенберг И.М. Хроническое воздействие ртути на организм / И.М. Трахтенберг. – Киев: Здоров'я, 1969. – 392 с.

123. Трубина М.Р. Динамика лесной растительности после снижения промышленных выбросов: быстрое восстановление или продолжение деградации / М.Р. Трубина, Е.Л. Воробейчик, Е.В. Хантемирова, и др. // Докл. РАН. – 2014. – Т. 458. – С. 721–725.

124. Шварц С.С. Внутривидовая изменчивость млекопитающих и методы ее изучения / С.С. Шварц // Зоологический журнал. – 1963. – Т. 42. – № 3. – С. 417–433.

125. Шварц С.С. Метод морфологических индикаторов в экологии наземных позвоночных / С.С. Шварц, В.С. Смирнов, Л.Н. Добринский. – Свердловск: УФ АН СССР, 1968. – 389 с.

126. Яблоков А.В. Изменчивость млекопитающих / А.В. Яблоков. – М.: Наука, 1966. – 363 с.

127. MMCSOft. Камера для подсчета сперматозоидов MMC-SR [Электронный ресурс] / MMCSOft. – Режим доступа: <https://mmcatalog.com/sperm/SpermCountingChamber.html> (дата обращения: 15.03.2022).

128. Aburto E.M. The failure of selenium supplementation to prevent copper-induced liver damage in Fischer 344 rats. / E.M. Aburto, A. Cribb, I.C. Fuentealba, et al. // Canadian Journal of Veterinary Research. – 2001. – Vol. 65. – № 2. – P. 104–110.

129. Adamkovicova M. Computer assisted semen analysis of epididymal spermatozoa after an interperitoneal administration of diazinon and cadmium / M. Adamkovicova, R. Toman, M. Cabaj, et al. // *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*. – 2012. – Vol. 45. – № 1. – P. 105–110.
130. Adebayo O.A. The coagulating gland in the male greater cane rat (*Thryonomys swinderianus*): morphological and immunohistochemical features / O.A. Adebayo, A.K. Akinloye, A.O. Ihunwo, et al. // *Folia Morphologica*. – 2015. – Vol. 74. – № 1. – P. 25–32.
131. Amann R.P. Computerized evaluation of stallion spermatozoa. / R.P. Amann // *Proceedings of the annual convention of the American Association of Equine Practitioners*. – Lexington: Ky, 1988. – P. 453–473.
132. Amann R.P. Detection of differences in fertility / R.P. Amann, R.H. Hammerstedt // *Journal of andrology*. – 2002. – Vol. 23. – № 3. – P. 317–325.
133. Amann R.P. Andrology lab corner*: Reflections on casa after 25 years / R.P. Amann, D.F. Katz // *Journal of andrology*. – 2004. – Vol. 25. – № 3. – P. 317–325.
134. Amann R.P. Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments / R.P. Amann, D. Waberski // *Theriogenology*. – 2014. – Vol. 81. – № 1. – P. 5–17.
135. Amiard-Triquet C. Contribution to the ecotoxicological study of cadmium, copper and zinc in the mussel *Mytilus edulis* / C. Amiard-Triquet, B. Berthet, C. Metayer, et al. // *Marine Biology*. – 1986. – Vol. 92. – № 1. – P. 7–13.
136. Amstislavsky S. Reproductive technologies relevant to the genome resource bank in Carnivora / S. Amstislavsky, H. Lindeberg, G.C. Luvoni // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2012. – Vol. 47. – № 1. – P. 164–175.
137. Amuno S. Heavy metal bioaccumulation and histopathological alterations in wild Arctic hares (*Lepus arcticus*) inhabiting a former lead-zinc mine in the Canadian high Arctic: a preliminary study / S. Amuno, S. Niyogi, M. Amuno, et al. // *Science of the Total Environment*. – 2016. – Vol. 556. – P. 252–263.

138. Anderson R.A. Relationship between semen characteristics and fertility in electroejaculated mice / R.A. Anderson, C. Oswald, B.R. Willis, et al. // *Reproduction*. – 1983. – Vol. 68. – № 1. – P. 1–7.
139. Andjelkovic M. Toxic effect of acute cadmium and lead exposure in rat blood, liver, and kidney / M. Andjelkovic, A. Buha Djordjevic, E. Antonijevic, et al. // *International journal of environmental research and public health*. – 2019. – Vol. 16. – № 2. – P. 274.
140. Au D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review / D.W.T. Au // *Marine pollution bulletin*. – 2004. – Vol. 48. – № 9–10. – P. 817–834.
141. Baberschke N. Ion-rich potash mining effluents affect sperm motility parameters of European perch, *Perca fluviatilis*, and impair early development of the common roach, *Rutilus rutilus* / N. Baberschke, F. Schaefer, T. Meinelt, et al. // *Science of The Total Environment*. – 2021. – Vol. 752. – P. 141938.
142. Barquero V. Relationship between Fertility Traits and Kinematics in Clusters of Boar Ejaculates / V. Barquero, E.R.S. Roldan, C. Soler, et al. // *Biology*. – 2021a. – Vol. 10. – № 7. – P. 595 (1–15).
143. Barquero V. A Bayesian analysis of boar spermatozoa kinematics and head morphometrics and their relationship with litter size fertility variables / V. Barquero, C. Soler, F. Sevilla, et al. // *Reproduction in Domestic Animals*. – 2021b. – Vol. 56. – № 7. – P. 1024–1033.
144. Bauer M. Variation of sperm head shape and tail length in a species of Australian hydromyine rodent: the spinifex hopping mouse, *Notomys alexis* / M. Bauer, W.G. Breed // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2006. – Vol. 18. – № 7. – P. 797–805.
145. Beatty R.A. Spermatozoan characteristics in mice of different ages / R.A. Beatty, D.P. Mukherjee // *Journal Of Reproduction And Fertility*. – 1963. – Vol. 6. – № 2. – P. 261–268.
146. Beatty R.A. III.—Genetics of Gametes. III. Strain Differences in Spermatozoa from Eight Inbred Strains of Mice / R.A. Beatty, K.N. Sharma // *Proceedings of the Royal*

Society of Edinburgh, Section B: Biological Sciences. – 1961. – Vol. 68. – № 1. – P. 25–53.

147. Beatty R.A. The genetics of the mammalian gamete / R.A. Beatty // *Biological Reviews*. – 1970. – Vol. 45. – № 1. – P. 73–117.

148. Beernaert J. Non-destructive pollution exposure assessment by means of wood mice hair / J. Beernaert, J. Scheirs, H. Leirs, et al. // *Environmental Pollution*. – 2007. – Vol. 145. – № 2. – P. 443–451.

149. Behringer R. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual / R. Behringer, M. Gertsenstein, K.V. Nagy, et al. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2014. – 814 p.

150. Beigy M. Cvcqv: Coefficient of Variation (CV) with Confidence Intervals (CI). R package version 1.0.0 / M. Beigy. – 2019.

151. Belskii E.A. Bird diversity and dissimilarity show contrasting patterns along heavy metal pollution gradients in the Urals, Russia / E.A. Belskii, V.S. Mikryukov // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2018. – Vol. 25. – № 20. – P. 19530–19545.

152. Bennet J.P. Rats and mice / J.P. Bennet, B.H. Vickery // *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals*. – Philadelphia (PA): Lea and Febiger, 1970. – P. 299–315.

153. Bierla J.B. Sperm morphology of the Eurasian beaver, *Castor fiber*: an example of a species of rodent with highly derived and pleiomorphic sperm populations / J.B. Bierla, Z. Gizejewski, C.M. Leigh, et al. // *Journal of Morphology*. – 2007. – Vol. 268. – № 8. – P. 683–689.

154. Bilińska B. Hormonal status of male reproductive system: androgens and estrogens in the testis and epididymis. In vivo and in vitro approaches / B. Bilińska, B. Wiszniewska, K. Kosiniak-Kamysz, et al. // *Reproductive biology*. – 2006. – Vol. 6. – № supplement 1. – P. 43–58.

155. Birnbaum D. An electroejaculation technique for rats / D. Birnbaum, T. Hall // *Anat. Rec.* – 1961. – Vol. 140. – P. 49–50.

156. Björndahl L. A Practical Guide to Basic Laboratory Andrology / L. Björndahl, D. Mortimer, C.L.R. Barratt, et al. – Cambridge University Press, 2010. – 336 p.
157. Boersma A. Microsurgical and percutaneous epididymal sperm aspiration for sperm collection from live mice / A. Boersma, O. Olszanska, I. Walter, et al. // Journal of the American Association for Laboratory Animal Science. – 2015. – Vol. 54. – № 5. – P. 471–477.
158. Bondrup-Nielsen S. Reproduction and spacing behaviour of females in a peak density population of *Clethrionomys glareolus* / S. Bondrup-Nielsen, R.A. Ims // Ecography. – 1986. – Vol. 9. – № 2. – P. 109–112.
159. Boorman E. Sperm (ejaculate) competition in *Drosophila melanogaster*, and the reproductive value of females to males in relation to female age and mating status / E. Boorman, G.A. Parker // Ecological Entomology. – 1976. – Vol. 1. – № 3. – P. 145–155.
160. Breed W.G. Evolution of the spermatozoon in muroid rodents / W.G. Breed // Journal of Morphology. – 2005. – Vol. 265. – № 3. – P. 271–290.
161. Breed W.G. Body mass, testes mass, and sperm size in murine rodents / W.G. Breed, J. Taylor // Journal of Mammalogy. – 2000. – Vol. 81. – № 3. – P. 758–768.
162. Breed W.G. The spermatozoon of Eurasian murine rodents: its morphological diversity and evolution / W.G. Breed // Journal of morphology. – 2004. – Vol. 261. – № 1. – P. 52–69.
163. Brumbaugh W.G. Metal exposure and effects in voles and small birds near a mining haul road in Cape Krusenstern National Monument, Alaska / W.G. Brumbaugh, M.A. Mora, T.W. May, et al. // Environmental monitoring and assessment. – 2010. – Vol. 170. – № 1. – P. 73–86.
164. Bucci L.R. Effects of busulfan on murine spermatogenesis: cytotoxicity, sterility, sperm abnormalities, and dominant lethal mutations / L.R. Bucci, M.L. Meistrich // Mutation Research. – 1987. – Vol. 176. – № 2. – P. 259–268.
165. Buffone M.G. Heads or tails? Structural events and molecular mechanisms that promote mammalian sperm acrosomal exocytosis and motility / M.G. Buffone, T.W. Ijiri,

- W. Cao, et al. // *Molecular reproduction and development*. – 2012. – Vol. 79. – № 1. – P. 4–18.
166. Burruel V.R. Normal mice develop from oocytes injected with spermatozoa with grossly misshapen heads / V.R. Burruel, R. Yanagimachi, W.K. Whitten // *Biology of reproduction*. – 1996. – Vol. 55. – № 3. – P. 709–714.
167. Calvo A. Classification and quantification of abnormal sperm along the epididymal tract. Comparison between adult and aged hamsters / A. Calvo, E. Martinez, L.M. Pastor, et al. // *Reproduction Nutrition Development*. – 1997. – Vol. 37. – № 6. – P. 661–673.
168. Camizuli E. Trace metals from historical mining sites and past metallurgical activity remain bioavailable to wildlife today / E. Camizuli, R. Scheifler, S. Garnier, et al. // *Scientific reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 1–11.
169. Carballada R. Role of fluid from seminal vesicles and coagulating glands in sperm transport into the uterus and fertility in rats / R. Carballada, P. Esponda // *Reproduction*. – 1992. – Vol. 95. – № 3. – P. 639–648.
170. Chapin R.E. The relationships among reproductive endpoints in Swiss mice, using the reproductive assessment by continuous breeding database / R.E. Chapin, R.A. Sloane, J.K. Haseman // *Toxicological Sciences*. – 1997. – Vol. 38. – № 2. – P. 129–142.
171. Chemes H.E. Sperm pathology: a step beyond descriptive morphology. Origin, characterization and fertility potential of abnormal sperm phenotypes in infertile men / H.E. Chemes, V.Y. Rawe // *Human Reproduction Update*. – 2003. – Vol. 9. – № 5. – P. 405–428.
172. Chen X. Anti-fertility effect of levonorgestrel and/or quinestrol on striped field mouse (*Apodemus agrarius*): evidence from both laboratory and field experiments / X. Chen, X. Hou, T. Feng, et al. // *Integrative Zoology*. – 2021. – P. 1–12.
173. Chenoweth P.J. *Animal andrology: theories and applications* / P.J. Chenoweth, S. Lorton. – Wallingford: Cabi, 2014. – 568 p.
174. Chubb C. Reversibility of damage to testicular vasculature resulting from exposure to toxic agents / C. Chubb // *Reversibility in Testicular Toxicity Assessment*. – 1992. – P. 128–143.

175. Cooper T.G. Sperm maturation in the epididymis: a new look at an old problem / T.G. Cooper // *Asian journal of andrology*. – 2007. – Vol. 9. – № 4. – P. 533–539.
176. Corpas I. Lead intoxication in gestational and lactation periods alters the development of male reproductive organs / I. Corpas, M. Castillo, D. Marquina, et al. // *Ecotoxicology and Environmental Safety*. – 2002. – Vol. 53. – № 2. – P. 259–266.
177. Crosier A.E. Ejaculate traits in the Namibian cheetah (*Acinonyx jubatus*): influence of age, season and captivity / A.E. Crosier, L. Marker, J. Howard, et al. // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2007. – Vol. 19. – № 2. – P. 370–382.
178. Cummins J.M. On mammalian sperm dimensions / J.M. Cummins, P.F. Woodall // *Reproduction*. – 1985. – Vol. 75. – № 1. – P. 153–175.
179. Damek-Poprawa M. Damage to the liver, kidney, and testis with reference to burden of heavy metals in yellow-necked mice from areas around steelworks and zinc smelters in Poland / M. Damek-Poprawa, K. Sawicka-Kapusta // *Toxicology*. – 2003. – Vol. 186. – № 1–2. – P. 1–10.
180. Damek-Poprawa M. Histopathological changes in the liver, kidneys, and testes of bank voles environmentally exposed to heavy metal emissions from the steelworks and zinc smelter in Poland / M. Damek-Poprawa, K. Sawicka-Kapusta // *Environmental Research*. – 2004. – Vol. 96. – № 1. – P. 72–78.
181. Drobnis E.Z. Hamster sperm penetration of the zona pellucida: kinematic analysis and mechanical implications / E.Z. Drobnis, A.I. Yudin, G.N. Cherr, et al. // *Developmental Biology*. – 1988. – Vol. 130. – № 1. – P. 311–323.
182. Dulya O.V. Pollution-induced slowdown of coarse woody debris decomposition differs between two coniferous tree species / O.V. Dulya, I.E. Bergman, V.V. Kukarskih, et al. // *Forest Ecology and Management*. – 2019. – Vol. 448. – P. 312–320.
183. Dvorakova K. Sperm trains and mating behaviour in wood mice of the genus *Apodemus* / K. Dvorakova, P. Stopka. – 2004. – Vol. 16. – P. 260.
184. European Commission, Joint Research Centre. BCR-185R bovine liver (trace elements) [Электронный ресурс] / European Commission, Joint Research Centre. – Режим доступа: <https://crm.jrc.ec.europa.eu/p/40456/By-analyte-group/BCR-185R-BOVINE-LIVER-trace-elements/BCR-185R> (дата обращения: 21.03.2022).

185. Evans J.L. Anemia, iron storage and ceruloplasmin in copper nutrition in the growing rat / J.L. Evans, P.A. Abraham // *The Journal of Nutrition*. – 1973. – Vol. 103. – № 2. – P. 196–201.
186. Finaz C. Characterization of rat epithelial epididymal cells purified on a discontinuous Percoll gradient / C. Finaz, F. Boue, G. Meduri, et al. // *Reproduction*. – 1991. – Vol. 91. – № 2. – P. 617–625.
187. Firman R.C. Sperm competition and the evolution of the sperm hook in house mice / R.C. Firman, L.W. Simmons // *Journal of evolutionary biology*. – 2009. – Vol. 22. – № 12. – P. 2505–2511.
188. Fisher H.S. The dynamics of sperm cooperation in a competitive environment / H.S. Fisher, L. Giomi, H.E. Hoekstra, et al. // *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. – 2014. – Vol. 281. – № 1790. – P. 20140296.
189. Fisher H.S. Competition drives cooperation among closely related sperm of deer mice / H.S. Fisher, H.E. Hoekstra // *Nature*. – 2010. – Vol. 463. – № 7282. – P. 801–803.
190. Fitzpatrick J.L. Sexual selection and the evolution of sperm quality / J.L. Fitzpatrick, S. Lüpold // *Molecular Human Reproduction*. – 2014. – Vol. 20. – № 12. – P. 1180–1189.
191. Flaherty S.P. Localization of actin in the sperm head of the plains mouse, *Pseudomys australis* / S.P. Flaherty, W.G. Breed, V. Sarafis // *Journal of Experimental Zoology*. – 1983. – Vol. 225. – № 3. – P. 497–500.
192. Friend G.F. The Sperms of the British Muridae / G.F. Friend // *Journal of Cell Science*. – 1936. – Vol. 2. – № 311. – P. 419–443.
193. Gage M.J.G. Mammalian sperm morphometry / M.J.G. Gage // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. – 1998. – Vol. 265. – № 1391. – P. 97–103.
194. García-Vázquez F.A. Importance of sperm morphology during sperm transport and fertilization in mammals / F.A. García-Vázquez, J. Gadea, C. Matás, et al. // *Asian Journal of Andrology*. – 2016. – Vol. 18. – № 6. – P. 844–850.
195. Gdula-Argasińska J. Further investigation of the heavy metal content of the teeth of the bank vole as an exposure indicator of environmental pollution in Poland / J. Gdula-

- Argasińska, J. Appleton, K. Sawicka-Kapusta, et al. // *Environmental Pollution*. – 2004. – Vol. 131. – № 1. – P. 71–79.
196. Gizejewski Z. Cottonseed feeding delivers sufficient quantities of gossypol as a male deer contraceptive / Z. Gizejewski, B. Szafranska, Z. Steplewski, et al. // *European Journal of Wildlife Research*. – 2008. – Vol. 54. – № 3. – P. 469–477.
197. Gómez Montoto L. Sperm competition, sperm numbers and sperm quality in muroid rodents / L. Gómez Montoto, C. Magaña, M. Tourmente, et al. // *PLoS One*. – 2011a. – Vol. 6. – № 3. – P. 1-10/e18173.
198. Gómez Montoto L. Sperm competition differentially affects swimming velocity and size of spermatozoa from closely related muroid rodents: head first / L. Gómez Montoto, M.V. Sánchez, M. Tourmente, et al. // *Reproduction*. – 2011b. – Vol. 142. – № 6. – P. 819–830.
199. Gunes S. Effects of aging on the male reproductive system / S. Gunes, G.N.T. Hekim, M.A. Arslan, et al. // *Journal of assisted reproduction and genetics*. – 2016. – Vol. 33. – № 4. – P. 441–454.
200. Hébert C.D. Subchronic toxicity of cupric sulfate administered in drinking water and feed to rats and mice / C.D. Hébert, M.R. Elwell, G.S. Travlos, et al. // *Fundamental and applied toxicology*. – 1993. – Vol. 21. – № 4. – P. 461–475.
201. Hernandez I. Programmable system for semen collection in mice / I. Hernandez, B. Quintanilla, E. Cardiel, et al. // (ICEEE). 1st International Conference on Electrical and Electronics Engineering. – Acapulco, Mexico: IEEE, 2004. – P. 505–509.
202. Heske E.J. Concentrations of selected elements, physical condition, reproductive activity, and demographic patterns in small mammals nhabiting DePue wildlife managaement area / E.J. Heske, J.M. Levengood, K.D. Caldwell. – Illinois Waste Management and Research Center, 2003.
203. Hirth H.F. The spermatozoa of some North American bats and rodents / H.F. Hirth // *Journal of morphology*. – 1960. – Vol. 106. – № 1. – P. 77–83.
204. Hughes R.L. Comparative morphology of spermatozoa from five marsupial families. / R.L. Hughes // *Australian Journal of Zoology*. – 1965. – Vol. 13. – № 4. – P. 533–544.

205. Hunter B.A. Ecotoxicology of copper and cadmium in a contaminated grassland ecosystem. III. Small mammals / B.A. Hunter, M.S. Johnson, D.J. Thompson // *Journal of Applied Ecology*. – 1987. – P. 601–614.
206. Ieradi L.A. Evaluation of genotoxic damage in wild rodents from a polluted area in the Czech Republic / L.A. Ieradi, J. Zima, F. Allegra, et al. // *Folia Zoologica*. – 2003. – Vol. 52. – № 1. – P. 57–66.
207. Immler S. By hook or by crook? Morphometry, competition and cooperation in rodent sperm / S. Immler, H.D. Moore, W.G. Breed, et al. // *PloS one*. – 2007. – Vol. 2. – № 1. – P. e170.
208. Johnson S.L. Consistent age-dependent declines in human semen quality: a systematic review and meta-analysis / S.L. Johnson, J. Dunleavy, N.J. Gemmell, et al. // *Ageing research reviews*. – 2015. – Vol. 19. – P. 22–33.
209. Kalela O. Regulation of reproduction rate in subarctic populations of the vole, *Clethrionomys rufocanus* (Sund.). / O. Kalela // *Annales Academiae Scientiarum Fennicae, Series A IV, Biologica*. – 1957. – Vol. 34. – P. 1–60.
210. Katz D.F. Factors regulating mammalian sperm migration through the female reproductive tract and oocyte vestments / D.F. Katz, E.Z. Drobnis, J.W. Overstreet // *Gamete research*. – 1989. – Vol. 22. – № 4. – P. 443–469.
211. Katz D.F. The response of rhesus monkey sperm motility to cervical mucus and solid surfaces / D.F. Katz, D.M. Phillips // *Gamete research*. – 1986. – Vol. 13. – № 3. – P. 231–239.
212. Kenagy G.J. Size and function of mammalian testes in relation to body size / G.J. Kenagy, S.C. Trombulak // *Journal of Mammalogy*. – 1986. – Vol. 67. – № 1. – P. 1–22.
213. Kipper B.H. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF / B.H. Kipper, J.T. Trevizan, J.T. Carreira, et al. // *Theriogenology*. – 2017. – Vol. 87. – P. 154–160.
214. Kishikawa H. Chromosome analysis of BALB/c mouse spermatozoa with normal and abnormal head morphology / H. Kishikawa, H. Tateno, R. Yanagimachi // *Biology of reproduction*. – 1999. – Vol. 61. – № 3. – P. 809–812.

215. Klemme I. Contrasting effects of large density changes on relative testes size in fluctuating populations of sympatric vole species / I. Klemme, C.D. Soulsbury, H. Henttonen // Proceedings of the royal society B: Biological Sciences. – 2014. – Vol. 281. – № 1792. – P. 20141291.
216. Koehler J.K. Observations on the fine structure of vole spermatozoa with particular reference to cytoskeletal elements in the mature sperm head / J.K. Koehler // Gamete Research. – 1978. – Vol. 1. – № 3-4. – P. 247–257.
217. Kohli B.A. Phylogeography of a Holarctic rodent (*Myodes rutilus*): Testing high-latitude biogeographical hypotheses and the dynamics of range shifts / B.A. Kohli, V.B. Fedorov, E. Waltari, et al. // Journal of Biogeography. – 2015. – Vol. 42. – № 2. – P. 377–389.
218. Korkina I.N. Humus Index as an indicator of the topsoil response to the impacts of industrial pollution / I.N. Korkina, E.L. Vorobeichik // Applied Soil Ecology. – 2018. – Vol. 123. – P. 455–463.
219. Kotula-Balak M. Do photoperiod and endocrine disruptor 4-tert-octylphenol effect on spermatozoa of bank vole (*Clethrionomys glareolus*)? / M. Kotula-Balak, P. Grzmil, K. Chojnacka, et al. // General and comparative endocrinology. – 2014. – Vol. 201. – P. 21–29.
220. Kozdrowski R. The effect of season on the properties of wild boar (*Sus scrofa* L.) semen / R. Kozdrowski, A. Dubiel // Animal reproduction science. – 2004. – Vol. 80. – № 3–4. – P. 281–289.
221. Kozlov M. Impacts of point pollutants on terrestrial biota: Comparative analysis of 18 contaminated areas. Vol. 15 / M. Kozlov, E. Zvereva, V. Zverev. – Dordrecht: Springer Science & Business Media, 2009.
222. Krebs C.J. Demographic changes in fluctuating populations of *Microtus californicus* / C.J. Krebs // Ecological monographs. – 1966. – Vol. 36. – № 3. – P. 239–273.
223. Kruczek M. Reproductive capacity of male bank voles (*Myodes glareolus* Schreber, 1780)-age-dependent changes in functional activity of epididymal sperm /

- M. Kruczek, J. Styrna, J. Kapusta // *Belgian Journal of Zoology*. – 2013. – Vol. 143. – № 2. – P. 131–141.
224. Kryštufek B. Back to the future: the proper name for red-backed voles is *Clethrionomys Tilesius* and not *Myodes Pallas* / B. Kryštufek, A.S. Tesakov, V.S. Lebedev, et al. // *Mammalia*. – 2020. – Vol. 84. – № 2. – P. 214–217.
225. Lakoski K.A. Epididymal maturation and the acrosome reaction in mouse sperm: response to zona pellucida develops coincident with modification of M42 antigen / K.A. Lakoski, C.P. Carron, C.L. Cabot, et al. // *Biology of reproduction*. – 1988. – Vol. 38. – № 1. – P. 221–233.
226. Lehmann E. Über die morphologie und den taxonomischen wert von kleinsäugetierspermien / E. Lehmann, H.E. Schaefer // *Bonner Zoologische Beiträge*. – 1974. – Vol. 25. – P. 23–27.
227. Levengood J.M. Heavy metal exposure, reproductive activity, and demographic patterns in white-footed mice (*Peromyscus leucopus*) inhabiting a contaminated floodplain wetland / J.M. Levengood, E.J. Heske // *Science of the Total Environment*. – 2008. – Vol. 389. – № 2–3. – P. 320–328.
228. Levin A.A. Heavy metal alterations of placental function: a mechanism for the induction of fetal toxicity in cadmium / A.A. Levin, R.K. Miller, P.A. Sant'Agnes // *Reproductive and developmental toxicity of metals*. – Springer, 1983. – P. 633–654.
229. Li H. Ejaculated mouse sperm enter cumulus-oocyte complexes more efficiently in vitro than epididymal sperm / H. Li, P. Hung, S.S. Suarez // *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 5. – P. e0127753.
230. Linder M.C. Copper and genomic stability in mammals / M.C. Linder // *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. – 2001. – Vol. 475. – № 1–2. – P. 141–152.
231. Llobet J.M. Reproductive toxicology of aluminum in male mice / J.M. Llobet, M.T. Colomina, J.J. Sirvent, et al. // *Fundamental and applied toxicology*. – 1995. – Vol. 25. – № 1. – P. 45–51.

232. Löfgren O. Do intrinsic or extrinsic factors limit reproduction in cyclic populations of *Clethrionomys glareolus* and *C. rufocanus*? / O. Löfgren // *Ecography*. – 1989. – Vol. 12. – № 1. – P. 54–59.
233. Lukáň M. Heavy metals in alpine terrestrial invertebrates / M. Lukáň // *Oecologia Montana*. – 2009. – Vol. 18. – № 1–2. – P. 31–38.
234. Lüpold S. How sperm competition shapes the evolution of testes and sperm: a meta-analysis / S. Lüpold, R.A. de Boer, J.P. Evans, et al. // *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. – 2020. – Vol. 375. – № 1813. – P. 20200064.
235. Lüpold S. Sperm competition selects beyond relative testes size in birds / S. Lüpold, G.M. Linz, J.W. Rivers, et al. // *Evolution: International Journal of Organic Evolution*. – 2009. – Vol. 63. – № 2. – P. 391–402.
236. Lüpold S. Sperm form and function: what do we know about the role of sexual selection? / S. Lüpold, S. Pitnick // *Reproduction*. – 2018. – Vol. 155. – № 5. – P. R229–R243.
237. Malo A.F. Sperm design and sperm function / A.F. Malo, M. Gomendio, J. Garde, et al. // *Biology letters*. – 2006. – Vol. 2. – № 2. – P. 246–249.
238. Mammals and birds as bioindicators of trace element contaminations in terrestrial environments: an ecotoxicological assessment of the Northern Hemisphere. *Mammals and birds ...* / ed. E. Kalisińska. – Szczecin: Springer, 2019. – 708 p.
239. Marchlewicz M. Effectiveness of blood-testis and blood-epididymis barriers for lead / M. Marchlewicz // *Annales Academiae Medicae Stetinensis*. – 1994. – Vol. 40. – P. 37–51.
240. Maree L. Quantification and identification of sperm subpopulations using computer-aided sperm analysis and species-specific cut-off values for swimming speed / L. Maree, G. van der Horst // *Biotechnic & Histochemistry*. – 2013. – Vol. 88. – № 3–4. – P. 181–193.
241. Martí J.I. Head morphometric changes in cryopreserved ram spermatozoa are related to sexual maturity / J.I. Martí, I.M. Aparicio, M. García-Herreros // *Theriogenology*. – 2011. – Vol. 75. – № 3. – P. 473–481.

242. Martínez A.F. Sperm parameters on Iberian red deer: electroejaculation and post-mortem collection / A.F. Martínez, F. Martínez-Pastor, M. Álvarez, et al. // *Theriogenology*. – 2008. – Vol. 70. – № 2. – P. 216–226.
243. Martiniakova M. Accumulation of risk elements in kidney, liver, testis, uterus and bone of free-living wild rodents from a polluted area in Slovakia / M. Martiniakova, R. Omelka, A. Jancova, et al. // *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. – 2012. – Vol. 47. – № 9. – P. 1202–1206.
244. Martiniaková M. Concentrations of selected heavy metals in bones and femoral bone structure of bank (*Myodes glareolus*) and common (*Microtus arvalis*) voles from different polluted biotopes in Slovakia / M. Martiniaková, R. Omelka, A. Jančová, et al. // *Archives of environmental contamination and toxicology*. – 2011. – Vol. 60. – № 3. – P. 524–532.
245. Matsumoto A.M. Chronic human chorionic gonadotropin administration in normal men: evidence that follicle-stimulating hormone is necessary for the maintenance of quantitatively normal spermatogenesis in man / A.M. Matsumoto, A.E. Karpas, W.J. Bremner // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1986. – Vol. 62. – № 6. – P. 1184–1192.
246. Mauss J. A new method for studying the effect of drugs on the testes of rats / J. Mauss, W. Gerkmann, R. Petry, et al. // *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie*. – 1970. – Vol. 266. – № 2. – P. 195–198.
247. McLennan H.J. Greater sperm complexity in the Australasian old endemic rodents (Tribe: Hydromyini) is associated with increased levels of inter-male sperm competition / H.J. McLennan, S. Lüpold, P. Smissen, et al. // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2017. – Vol. 29. – № 5. – P. 921–930.
248. Menkveld R. Clinical significance of the low normal sperm morphology value as proposed in the fifth edition of the WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen / R. Menkveld // *Asian journal of andrology*. – 2010. – Vol. 12. – № 1. – P. 47–58.

249. Mikryukov V.S. Phylogenetic signature of fungal response to long-term chemical pollution / V.S. Mikryukov, O.V. Dulya, M.V. Modorov // Soil Biology and Biochemistry. – 2020. – Vol. 140. – P. 107644 (1–13).
250. Miska-Schramm A. The effect of aluminum exposure on reproductive ability in the bank vole (*Myodes glareolus*) / A. Miska-Schramm, J. Kapusta, M. Kruczek // Biological trace element research. – 2017. – Vol. 177. – № 1. – P. 97–106.
251. Miska-Schramm A. Effect of copper exposure on reproductive ability in the bank vole (*Myodes glareolus*) / A. Miska-Schramm, M. Kruczek, J. Kapusta // Ecotoxicology. – 2014. – Vol. 23. – № 8. – P. 1546–1554.
252. Møller A.P. Ejaculate quality, testes size and sperm competition in primates / A.P. Møller // Journal of Human Evolution. – 1988. – Vol. 17. – № 5. – P. 479–488.
253. Møller A.P. Ejaculate quality, testes size and sperm production in mammals / A.P. Møller // Functional Ecology. – 1989. – P. 91–96.
254. Monteiro G.A. Cryopreservation and fertility of ejaculated and epididymal stallion sperm / G.A. Monteiro, F.O. Papa, F.S. Zahn, et al. // Animal reproduction science. – 2011. – Vol. 127. – № 3–4. – P. 197–201.
255. Moore H. Exceptional sperm cooperation in the wood mouse / H. Moore, K. Dvorakova, N. Jenkins, et al. // Nature. – 2002. – Vol. 418. – № 6894. – P. 174–177.
256. Mortimer S.T. The future of computer-aided sperm analysis / S.T. Mortimer, G. Van der Horst, D. Mortimer // Asian journal of andrology. – 2015. – Vol. 17. – № 4. – P. 545–553.
257. Mruk D.D. The mammalian blood-testis barrier: its biology and regulation / D.D. Mruk, C.Y. Cheng // Endocrine reviews. – 2015. – Vol. 36. – № 5. – P. 564–591.
258. Muller C.H. Rationale, interpretation, validation, and uses of sperm function tests / C.H. Muller // J Androl. – 2000. – Vol. 21. – № 1. – P. 10–30.
259. Murphy E.M. Influence of bull age, ejaculate number, and season of collection on semen production and sperm motility parameters in Holstein Friesian bulls in a commercial artificial insemination centre / E.M. Murphy, A.K. Kelly, C. O’Meara, et al. // Journal of animal science. – 2018. – Vol. 96. – № 6. – P. 2408–2418.

260. Nieschlag E. Reproductive functions in young fathers and grandfathers / E. Nieschlag, U. Lammers, C.W. Freischem, et al. // *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. – 1982. – Vol. 55. – № 4. – P. 676–681.
261. Nikolov I.G. Tissue accumulation of lanthanum as compared to aluminum in rats with chronic renal failure—possible harmful effects after long-term exposure / I.G. Nikolov, N. Joki, S. Vicca, et al. // *Nephron Experimental Nephrology*. – 2010. – Vol. 115. – № 4. – P. e112–e121.
262. Nobles C.J. Ambient air pollution and semen quality / C.J. Nobles, E.F. Schisterman, S. Ha, et al. // *Environmental Research*. – 2018. – Vol. 163. – P. 228–236.
263. Nolan C.V. An evaluation of tissue metallothionein and genetic resistance to cadmium toxicity in mice / C.V. Nolan, Z.A. Shaikh // *Toxicology and applied pharmacology*. – 1986. – Vol. 85. – № 2. – P. 135–144.
264. Ntemka A. Impact of old age and season on Chios ram semen quality / A. Ntemka, E. Kioussis, C. Boscios, et al. // *Small Ruminant Research*. – 2019. – Vol. 178. – P. 15–17.
265. Nyholm N.E.I. Reproduction of the bank vole, *Clethrionomys glareolus*, in northern and southern Sweden during several seasons and in different phases of the vole population cycle / N.E.I. Nyholm, P. Meurling // *Ecography*. – 1979. – Vol. 2. – № 1. – P. 12–20.
266. Orekhova N.A. Structural-functional modifications of the liver to chronic radioactive exposure in pygmy wood mouse (*Apodemus uralensis*) within the East-Urals Radioactive Trace / N.A. Orekhova, M.V. Modorov, Y.A. Davydova // *Journal of environmental radioactivity*. – 2019. – Vol. 199. – P. 25–38.
267. Oshio S. Effects of gradient centrifugation on human sperm / S. Oshio, S. Kaneko, R. Iizuka, et al. // *Archives of andrology*. – 1987. – Vol. 19. – № 1. – P. 85–93.
268. Ostoich P.V. Nefarious, but in different way: comparing the ecotoxicity, gene toxicity and mutagenicity of lead (Pb) and cadmium (Cd) in the context of small mammal ecotoxicology / P.V. Ostoich, M. Beltcheva, R. Metcheva // *Genotoxicity and Mutagenicity* / coll. S. Soloneski, M.L. Larramendy. – Rijeka: IntechOpen, 2020. – P.1 – 18 (Ch. 4).

269. Pahl T. Sperm morphology of the Rattini—are the interspecific differences due to variation in intensity of intermale sperm competition? / T. Pahl, H.J. McLennan, Y. Wang, et al. // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2018. – Vol. 30. – № 11. – P. 1434–1442.
270. Pankakoski E. Shrews as indicators of heavy metal pollution / E. Pankakoski, I. Koivisto, H. Hyvärinen, et al. // *Advances in the biology of shrews*. – Pittsburgh, Pennsylvania: Carnegie Museum of Natural History, 1994. – Vol. 18. – P. 136–147.
271. Parizek J. Cadmium and reproduction: a perspective after 25 years / J. Parizek // *Reproductive and developmental toxicity of metals*. – Springer, 1983. – P. 301–313.
272. Parker G.A. Sperm competition and the evolution of the precopulatory passive phase behaviour in *Locusta migratoria migratorioides* / G.A. Parker, J.L. Smith // *Journal of Entomology Series A, General Entomology*. – 1975. – Vol. 49. – № 2. – P. 155–171.
273. Parker G.A. Sperm competition and its evolutionary consequences in the insects / G.A. Parker // *Biological reviews*. – 1970. – Vol. 45. – № 4. – P. 525–567.
274. Peng N. Comparison of different counting chambers using a computer-assisted semen analyzer / N. Peng, X. Zou, L. Li // *Systems biology in reproductive medicine*. – 2015. – Vol. 61. – № 5. – P. 307–313.
275. Pereira R. Tissues and hair residues and histopathology in wild rats (*Rattus rattus* L.) and Algerian mice (*Mus spretus* Lataste) from an abandoned mine area (Southeast Portugal) / R. Pereira, M.L. Pereira, R. Ribeiro, et al. // *Environmental Pollution*. – 2006. – Vol. 139. – № 3. – P. 561–575.
276. Pesch S. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation / S. Pesch, M. Bergmann // *Micron*. – 2006. – Vol. 37. – № 7. – P. 597–612.
277. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL: <https://www.R-project.org/> / R Core Team. – 2021.
278. Rafique M. The effects of lead and zinc on the quality of semen of albino rats / M. Rafique, N. Khan, K. Perveen, et al. // *Journal of the College of Physicians and Surgeons Pakistan*. – 2009. – Vol. 19. – № 8. – P. 510–513.

279. Retzius G. Biologische Untersuchungen. Vol. 14 / G. Retzius. – Stockholm: Aftonbladets Druckerei, 1909. – 230 p.
280. Ribeiro L.R. Activity of ethylene oxide in the mouse sperm morphology test / L.R. Ribeiro, D.M.F. Salvadori, C.A.B. Pereira, et al. // Archives of toxicology. – 1987. – Vol. 60. – № 4. – P. 331–333.
281. Rogival D. Transfer and accumulation of metals in a soil–diet–wood mouse food chain along a metal pollution gradient / D. Rogival, J. Scheirs, R. Blust // Environmental Pollution. – 2007. – Vol. 145. – № 2. – P. 516–528.
282. Roldan E.R.S. The evolution of eutherian spermatozoa and underlying selective forces: female selection and sperm competition / E.R.S. Roldan, M. Gomendio, A.D. Vitullo // Biological Reviews. – 1992. – Vol. 67. – № 4. – P. 551–593.
283. Roldan E.R.S. Sperm competition and the evolution of sperm form and function in mammals / E.R.S. Roldan // Reproduction in Domestic Animals. – 2019. – Vol. 54. – P. 14–21.
284. Rolf C. Age-dependent changes in semen characteristics of patients attending a tertiary infertility clinic / C. Rolf, S. Kenkel, E. Nieschlag // 15th Annual Meeting of the European Society of Human Reproduction and Embryology. – Tours, France: Hum Reprod, 1999. – Vol. 14. – P. 288–289.
285. Rossi L.F. Morphological description and comparison of sperm from eighteen species of cricetid rodents / L.F. Rossi, N.U. De La Sancha, J.P. Luaces, et al. // Journal of Mammalogy. – 2018. – Vol. 99. – № 6. – P. 1398–1404.
286. Rothschild, Lord. The fertilization reaction in the sea-urchin egg: a propagated response to sperm attachment / Lord Rothschild, M. Swann // Journal of Experimental Biology. – 1949. – Vol. 26. – № 2. – P. 164–176.
287. Sánchez-Chardi A. Bioaccumulation of metals and effects of a landfill in small mammals Part III: structural alterations / A. Sánchez-Chardi, C. Peñarroja-Matutano, M. Borrás, et al. // Environmental research. – 2009a. – Vol. 109. – № 8. – P. 960–967.
288. Sánchez-Chardi A. Metals in liver and kidneys and the effects of chronic exposure to pyrite mine pollution in the shrew *Crocidura russula* inhabiting the protected wetland

- of Doñana / A. Sánchez-Chardi, C.A.O. Ribeiro, J. Nadal // *Chemosphere*. – 2009b. – Vol. 76. – № 3. – P. 387–394.
289. Šandera M. Variation in apical hook length reflects the intensity of sperm competition in murine rodents / M. Šandera, T. Albrecht, P. Stopka // *PLoS One*. – 2013. – Vol. 8. – № 7. – P. e68427.
290. Schipper A.M. Modeling the influence of environmental heterogeneity on heavy metal exposure concentrations for terrestrial vertebrates in river floodplains / A.M. Schipper, M. Loos, A.M.J. Ragas, et al. // *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*. – 2008. – Vol. 27. – № 4. – P. 919–932.
291. Schubert B. Computer-aided sperm analysis, the new key player in routine sperm assessment / B. Schubert, M. Badiou, A. Force // *Andrologia*. – 2019. – Vol. 51. – № 10. – P. e13417.
292. Seed J. Methods for assessing sperm motility, morphology, and counts in the rat, rabbit, and dog: a consensus report / J. Seed, R.E. Chapin, E.D. Clegg, et al. // *Reproductive toxicology*. – 1996. – Vol. 10. – № 3. – P. 237–244.
293. Sengupta P. The aging sperm: Is the male reproductive capacity ticking to biological extinction? / P. Sengupta, U. Nwagha // *Journal of Basic and Clinical Reproductive Sciences*. – 2014. – Vol. 3. – № 1. – P. 1–7.
294. Sheffield S.R. Rodentia and Lagomorpha / S.R. Sheffield, K. Sawiska-Kapusta, J.B. Cohen // *Ecotoxicology of Wild mammals: Ecological and Environmental Toxicology Series* / eds. R.F. Shore, B.A. Rattner publisher: John Wiley and Sons, Ltd, Chichester. – Chichester: Wiley, 2001. – P. 215–314.
295. Shenbrot G.I. Atlas of the geographic distribution of the arvicoline rodents of the world (Rodentia, Muridae: Arvicolinae) / G.I. Shenbrot, B.R. Krasnov. – Sofia: Pensoft, 2005. – 336 p.
296. Silva E.F. de S.J. Mercury at environmental relevant levels affects spermatozoa function and fertility capacity in bovine sperm / E.F. de S.J. Silva, D. Missio, C.S. Martinez, et al. // *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*. – 2019. – Vol. 82. – № 4. – P. 268–278.

297. Simmons L.W. Sperm wars and the evolution of male fertility / L.W. Simmons, J.L. Fitzpatrick // *Reproduction*. – 2012. – Vol. 144. – № 5. – P. 519–534.
298. Sipilä P. The lack of HSD17B3 in male mice results in disturbed Leydig cell maturation and endocrine imbalance akin to humans with HSD17B3 deficiency / P. Sipilä, A. Junnila, J. Hakkarainen, et al. // *The FASEB Journal*. – 2020. – Vol. 34. – № 5. – P. 6111–6128.
299. Skinner B.M. A high-throughput method for unbiased quantitation and categorization of nuclear morphology / B.M. Skinner, C.C. Rathje, J. Bacon, et al. // *Biology of reproduction*. – 2019. – Vol. 100. – № 5. – P. 1250–1260.
300. Smirnov G.Yu. Inter- and intraspecific variability of morphometric parameters of rodent spermatozoa / G.Yu. Smirnov, M.V. Modorov, Yu.A. Davydova // *Zoomorphology*. – 2021. – Vol. 140. – № 3. – P. 405–418.
301. Smith T. The viability of hamster spermatozoa stored in the isthmus of the oviduct: the importance of sperm-epithelium contact for sperm survival / T. Smith, R. Yanagimachi // *Biology of Reproduction*. – 1990. – Vol. 42. – № 3. – P. 450–457.
302. Snyder R.L. Collection of mouse semen by electroejaculation / R.L. Snyder // *The Anatomical Record*. – 1966. – Vol. 155. – № 1. – P. 11–14.
303. Soler C. Effect of counting chamber depth on the accuracy of lensless microscopy for the assessment of boar sperm motility / C. Soler, J.Á. Picazo-Bueno, V. Micó, et al. // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2018. – Vol. 30. – № 6. – P. 924–934.
304. Sperm biology: an evolutionary perspective / eds. T.R. Birkhead, D.J. Hosken, S.S. Pitnick. – USA, Boston: Academic press, 2009. – 642 p.
305. StatSoft I. STATISTICA (data analysis software system), version 8.0 [Электронный ресурс] / I. StatSoft (дата обращения: 22.03.2022).
306. Styrna J. Influence of the CBA genetic background on sperm morphology and fertilization efficiency in mice with a partial Y chromosome deletion / J. Styrna, W. Kilarski, H. Krzanowska // *Reproduction*. – 2003. – Vol. 126. – № 5. – P. 579–588.
307. Suarez S.S. Sperm transport and motility in the mouse oviduct: observations in situ / S.S. Suarez // *Biology of Reproduction*. – 1987. – Vol. 36. – № 1. – P. 203–210.

308. Sugawara N. Testicular dysfunction induced by cadmium and its improvement caused by selenium in the mouse / N. Sugawara, Y. Hirohata, C. Sugawara // *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*. – 1989. – Vol. 9. – № 1. – P. 53– 64.
309. Świergosz-Kowalewska R. Cadmium distribution and toxicity in tissues of small rodents / R. Świergosz-Kowalewska // *Microscopy Research and Technique*. – 2001. – Vol. 55. – № 3. – P. 208–222.
310. Syntin P. Sperm structural and motility changes during aging in the Brown Norway rat / P. Syntin, B. Robaire // *Journal of andrology*. – 2001. – Vol. 22. – № 2. – P. 235– 244.
311. Talmage S.S. Small mammals as monitors of environmental contaminants / S.S. Talmage, B.T. Walton // *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. – 1991. – № 119. – P. 47–145.
312. Tang W.H. Relationship of sperm morphology with reproductive hormone levels in infertile men / W.H. Tang, H. Jiang, L.L. Ma, et al. // *Zhonghua Nan Ke Xue = National Journal Of Andrology*. – 2012. – Vol. 18. – № 3. – P. 243–247.
313. Tannenbaum L.V. Rodent sperm analysis in field-based ecological risk assessment: pilot study at Ravenna army ammunition plant, Ravenna, Ohio / L.V. Tannenbaum, M. Bazar, M.S. Hawkins, et al. // *Environmental Pollution*. – 2003. – Vol. 123. – № 1. – P. 21–29.
314. Tannenbaum L.V. Validating mammalian resistance to stressor-mediated reproductive impact using rodent sperm analysis / L.V. Tannenbaum, J.C. Beasley // *Ecotoxicology*. – 2016. – Vol. 25. – № 3. – P. 584–593.
315. Tannenbaum L.V. Correlational Sperm Motility Analysis: Wild Rodent Progressive Sperm Motility as a Potentially Improved Reproduction-Assessment Parameter in Mammals / L.V. Tannenbaum, R.B. Lee // *Archives of environmental contamination and toxicology*. – 2011. – Vol. 60. – № 1. – P. 173–181.
316. Tannenbaum L.V. Rodent Sperm Analysis: A rationale for and path toward acceptance and use in ecological risk assessment / L.V. Tannenbaum // *Science of The Total Environment*. – 2020. – Vol. 716. – P. 1–8.

317. Tannenbaum L.V. Testing the limits of rodent sperm analysis: azoospermia in an otherwise healthy wild rodent population / L.V. Tannenbaum, B.H. Thran, K.J. Williams // Archives of environmental contamination and toxicology. – 2009. – Vol. 56. – № 1. – P. 157–164.
318. Tannenbaum L.V. Demonstrating ecological receptor health at contaminated sites with wild rodent sperm parameters / L.V. Tannenbaum, B.H. Thran, K.J. Williams // Archives of Environmental Contamination and Toxicology. – 2007. – Vol. 53. – № 3. – P. 459–465.
319. Tayama K. Measuring mouse sperm parameters using a particle counter and sperm quality analyzer: a simple and inexpensive method / K. Tayama, H. Fujita, H. Takahashi, et al. // Reproductive toxicology. – 2006. – Vol. 22. – № 1. – P. 92–101.
320. Tecirlioglu R.T. Semen collection from mice: electroejaculation / R.T. Tecirlioglu, E.S. Hayes, A.O. Trounson // Reproduction, Fertility and Development. – 2002. – Vol. 14. – № 6. – P. 363–371.
321. Tegelström H. Transfer of mitochondrial DNA from the northern red-backed vole (*Clethrionomys rutilus*) to the bank vole (*C. glareolus*) / H. Tegelström // Journal of Molecular Evolution. – 1987. – Vol. 24. – № 3. – P. 218–227.
322. Tête N. Histopathology related to cadmium and lead bioaccumulation in chronically exposed wood mice, *Apodemus sylvaticus*, around a former smelter / N. Tête, M. Durfort, D. Rieffel, et al. // Science of the Total Environment. – 2014. – Vol. 481. – P. 167–177.
323. Toman R. Changes in the testis and epididymis of rabbits after an intraperitoneal and peroral administration of cadmium / R. Toman, P. Massányi, V. Uhrin // Trace elements and electrolytes. – 2002. – Vol. 19. – № 3. – P. 114–117.
324. Torres K.C. Bioaccumulation of metals in plants, arthropods, and mice at a seasonal wetland / K.C. Torres, M.L. Johnson // Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal. – 2001. – Vol. 20. – № 11. – P. 2617–2626.
325. Tourmente M. Sperm competition and the evolution of sperm design in mammals / M. Tourmente, M. Gomendio, E.R.S. Roldan // BMC evolutionary biology. – 2011. – Vol. 11. – № 1. – P. 1–10.

326. Tourmente M. Performance of rodent spermatozoa over time is enhanced by increased ATP concentrations: the role of sperm competition / M. Tourmente, P. Villar-Moya, M. Varea-Sánchez, et al. // *Biology of reproduction*. – 2015. – Vol. 93. – № 3. – P. 64, 1–13.
327. Tourmente M. Is the hook of muroid rodent's sperm related to sperm train formation? / M. Tourmente, D. Zarka-Trigo, E.R.S. Roldan // *Journal of evolutionary biology*. – 2016. – Vol. 29. – № 6. – P. 1168–1177.
328. Ullah K. Heavy-metal levels in feathers of cattle egret and their surrounding environment: a case of the Punjab Province, Pakistan / K. Ullah, M.Z. Hashmi, R.N. Malik // *Archives of environmental contamination and toxicology*. – 2014. – Vol. 66. – № 1. – P. 139–153.
329. Valverde A. Sperm kinematic subpopulations of the American crocodile (*Crocodylus acutus*) / A. Valverde, O. Castro-Morales, M. Madrigal-Valverde, et al. // *Plos one*. – 2021. – Vol. 16. – № 3. – P. e0248270.
330. Valverde A. Effect of frame rate capture frequency on sperm kinematic parameters and subpopulation structure definition in boars, analysed with a CASA-Mot system / A. Valverde, M. Madrigal, C. Caldeira, et al. // *Reproduction In Domestic Animals*. – 2019. – Vol. 54. – № 2. – P. 167–175.
331. Van der Horst G. Not just the marriage of Figaro: but the marriage of WHO/ESHRE semen analysis criteria with sperm functionality / G. Van der Horst, S.S. du Plessis // *Adv. Androl. Online*. – 2017. – Vol. 4. – P. 6–21.
332. Van der Horst G. Current perspectives of CASA applications in diverse mammalian spermatozoa / G. van der Horst, L. Maree, S.S. du Plessis // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2018. – Vol. 30. – № 6. – P. 875–888.
333. Van Duijn C. The mean velocity and velocity distributions of normal bull spermatozoa at different hydrogen-ion concentrations, derived from photo-electric measurements / C. Van Duijn, R. Rikmenspoel // *The Journal of Agricultural Science*. – 1960. – Vol. 54. – № 3. – P. 300–309.

334. VanDemark N.L. Exploration of electronic methods for evaluating sperm motility / N.L. VanDemark, G.W. Salisbury, A.N. Moeller, et al. // *Science*. – 1958. – Vol. 127. – № 3293. – P. 286–287.
335. Varea-Sánchez M. Unraveling the sperm bauplan: relationships between sperm head morphology and sperm function in rodents / M. Varea-Sánchez, M. Tourmente, M. Bastir, et al. // *Biology of reproduction*. – 2016. – Vol. 95. – № 1. – P. 1–9.
336. Vorobeichik E. Long-term dynamics of the abundance of earthworms and enchytraeids (Annelida, Clitellata: Lumbricidae, Enchytraeidae) in forests of the Central Urals, Russia / E. Vorobeichik, A. Nesterkov, E. Golovanova, et al. // *Biodiversity Data Journal*. – 2021. – Vol. 9. – P. 1–20.
337. Wadi S.A. Effects of lead on the male reproductive system in mice / S.A. Wadi, G. Ahmad // *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A*. – 1999. – Vol. 56. – № 7. – P. 513–521.
338. Ward P.I. Intraspecific variation in sperm size characters / P.I. Ward // *Heredity*. – 1998. – Vol. 80. – № 6. – P. 655–659.
339. Weissenberg R. The fertilizing capacity of golden hamster epididymal spermatozoa in relation to age, number, motility and morphology / R. Weissenberg, R. Bella, B. Lunenfeld // *Andrologia*. – 1987. – Vol. 19. – № 1. – P. 47–53.
340. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. – 5th ed. – Geneva: World Health Organization, 2010. – 272 p.
341. Wickham H. Ggplot2: elegant graphics for data analysis / H. Wickham. – New York: Springer-Verlag, 2016. – 211+viii p.
342. Wijnhoven S. Heavy-metal concentrations in small mammals from a diffusely polluted floodplain: importance of species-and location-specific characteristics / S. Wijnhoven, R.S.E.W. Leuven, G. van der Velde, et al. // *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2007. – Vol. 52. – № 4. – P. 603–613.
343. Williams D.A. Multivariate analysis in the genetics of spermatozoan dimensions in mice / D.A. Williams, R.A. Beatty, P.S. Burgoyne // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. – 1970. – Vol. 175. – № 1040. – P. 313–331.

344. Wilson-Leedy J. ImageJ. Computer Assisted Sperm Analyzer [Электронный ресурс] / J. Wilson-Leedy, R. Ingermann. – Режим доступа: <https://imagej.nih.gov/ij/plugins/casa.html> (дата обращения: 01.03.2022).
345. Wolf K.N. Age-dependent changes in sperm production, semen quality, and testicular volume in the black-footed ferret (*Mustela nigripes*) / K.N. Wolf, D.E. Wildt, A. Vargas, et al. // *Biology of Reproduction*. – 2000. – Vol. 63. – № 1. – P. 179–187.
346. Wu X. A review of toxicity and mechanisms of individual and mixtures of heavy metals in the environment / X. Wu, S.J. Cobbina, G. Mao, et al. // *Environmental Science and Pollution Research*. – 2016. – Vol. 23. – № 9. – P. 8244–8259.
347. Wyrobek A.J. An evaluation of the mouse sperm morphology test and other sperm tests in nonhuman mammals: A report of the US environmental protection agency genotox program / A.J. Wyrobek, L.A. Gordon, J.G. Burkhart, et al. // *Mutation Research*. – 1983. – Vol. 115. – № 1. – P. 1–72.
348. Yamauchi Y. Preservation of ejaculated mouse spermatozoa from fertile C57BL/6 and infertile Hook1/Hook1 mice collected from the uteri of mated females / Y. Yamauchi, M.A. Ward // *Biology of reproduction*. – 2007. – Vol. 76. – № 6. – P. 1002–1008.
349. Yeste M. Evaluation of sperm motility with CASA-Mot: which factors may influence our measurements? / M. Yeste, S. Bonet, J.E. Rodríguez-Gil, et al. // *Reproduction, Fertility and Development*. – 2018. – Vol. 30. – № 6. – P. 789–798.
350. Zhang Y. Distribution of mammalian species in China / Y. Zhang, S.K. Jing, G.Q. Quan, et al. – Beijing: China Forestry Publishing, 1997. – 280 p.
351. Zorenko T.A. The spermatozoa structure peculiarities of the subgenus *Sumeriomys* (Rodentia, Arvicolinae, *Microtus*) / T.A. Zorenko, F.N. Golenishchev // *Russian Journal of Theriology*. Русский териологический журнал. – 2015. – Vol. 14. – № 1. – P. 105 – 111.
352. Zounkova R. In situ effects of urban river pollution on the mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* as part of an integrated assessment / R. Zounkova, V. Jalova, M. Janisova, et al. // *Aquatic toxicology*. – 2014. – Vol. 150. – P. 83–92.