

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН
(ИБР РАН)

УДК 576.5

Рег. № ГЗ 0108-2018-0012

Рег. № НИОКТР АААА-А18-118041690141-8

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
д-р биол. наук, чл.-корр. РАН
А.В. Васильев
«10» декабря 2018 г.



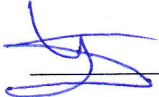
ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ КОРРЕКЦИИ ДЕФЕКТОВ СПЕРМАТОГЕНЕЗА EX VIVO С
ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПОПУЛЯЦИИ АКТИВНО ПРОЛИФЕРИРУЮЩИХ В КУЛЬТУРЕ
КЛЕТОК СЕРТОЛИ ВЗРОСЛОГО ОРГАНИЗМА

по Программе Президиума РАН № 42
«Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий»
(заключительный отчет)

Руководитель НИР,
старший научн. сотр.,
канд-т биол. наук

 10.12.2018 А.Ю. Кулибин
подпись, дата

Москва 2018

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, старший научный сотрудник, кандидат биологических наук,	 подпись, дата	А.Ю. Кулибин 10.12.2018
Исполнители: Научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Е.А. Малолина 9.12.2018
Младший научный сотрудник	 подпись, дата	А.А.. Цитрина 10.12.2018
Инженер исследователь	 подпись, дата	В.А. Почаев 9.12.2018
Нормоконтроль, ведущий научный сотрудник, кандидат биологических наук	 подпись, дата	Е.Б. Абрамова 06.12.2018

РЕФЕРАТ

Отчет 20 с., 2 разд., 2 рис., источников - 25, публикаций по теме - 2.

КЛЕТКИ СЕРТОЛИ, МУЖСКОЕ БЕСПЛОДИЕ, КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ, ФЕРТИЛЬНОСТЬ, ПРОЛИФЕРАЦИЯ, 3D-КУЛЬТУРЫ

Объектом исследования является минорная популяция активно пролиферирующих в культуре Сертоли-подобных клеток (СПК), а также популяция зрелых клеток Сертоли (КС) извитых семенных канальцев.

Проект направлен на разработку нового подхода в клеточной терапии (*ex vivo*) некоторых форм мужского бесплодия, связанных с нарушением функции поддерживающих клеток сперматогенной системы – КС.

Для достижения поставленной цели на первом этапе проекта было проведено культивирование СПК на средах различного состава. Изучали влияние низкомолекулярных ингибиторов Y-27632 (Y), PD0325901 (P), A-83-01 (A) и CHIR99021 (C), а также других компонентов культуральной среды на дифференцировку СПК в КС. Для этого оценивали уровень экспрессии СПК *Dmrt1*, ключевого транскрипционного фактора, играющего роль в дифференцировке и функционировании КС и изначально сниженного в популяции СПК ($2.5 \pm 0.9\%$ *Dmrt1*⁺ СПК). Исследование ингибиторов отдельно или в различных сочетаниях показало, что оптимальный эффект достигается при использовании трех ингибиторов (YAC): доля *Dmrt1*⁺ СПК составляет $33.9 \pm 2.3\%$. Установлена важность выбора сыворотки или ее заменителей. Оптимальной оказалась среда с 1% FBS ($50.3 \pm 1.5\%$ *Dmrt1*⁺ СПК). Также было отмечено, что в случае выращивания СПК на среде, содержащей 1% FBS и YAC, клетки приобретают эпителиальную морфологию и перестают экспрессировать альфа-мышечный актин, маркер, не характерный для КС. Оценена пролиферативная активность СПК. Показано, что добавление YAC значительно увеличивает пролиферативную активность всей популяции СПК и продлевает пролиферацию *Dmrt1*⁺ клеток. Установлено, что добавление к среде YAC позволяет культивировать СПК, по крайней мере, в течение 10 пассажей (двух месяцев), при этом экспрессия *Dmrt1* остается на высоком уровне до 3-4 пассажа. Проведены эксперименты по культивированию на среде с YAC дифференцированных КС. Показано, что YAC не способствует увеличению пролиферации таких клеток.

Впервые показано, что комплекс низкомолекулярных веществ YAC может быть успешно использован для длительного культивирования соматических поддерживающих клеток сперматогенной системы, что открывает возможность для использования этих клеток при разработке способов коррекции нарушений сперматогенеза.

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ	5
ВВЕДЕНИЕ	6
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	9
Раздел 1. РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СПК	9
1.1 Материал и методы	9
1.2 Результаты	10
Раздел 2. ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СПК И КС, А ТАКЖЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПАССИРОВАНИЯ	13
2.1 Материал и методы	13
2.2 Результаты	13
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	17
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	18
ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ ЗА 2018 ГОД	21

ПЕРЕЧЕНЬ ОБОЗНАЧЕНИЙ И СОКРАЩЕНИЙ

В настоящем отчете применяются следующие термины с соответствующими определениями:

Извитые семенные канальцы – структурная единица семенника, включающая в свой состав сперматогенный эпителий, состоящий из клеток Сертоли и развивающихся половых клеток.

Транзиторная зона семенника – область семенника, включающая в себя концевые участки извитых семенных канальцев и контактирующую с ними группу полостей, объединенных в единую сеть – сеть семенника. Транзиторная зона выполняет транспортную функцию, обеспечивая перемещение сперматозоидов из извитых канальцев в придаток семенника.

Клетки Сертоли – поддерживающие клетки сперматогенной системы, обеспечивающие развитие мужских половых клеток, расположены в извитых семенных канальцах.

Сертоли-подобные клетки – минорная популяция клеток, экспрессирующих маркеры клеток Сертоли, расположенная в транзитной зоне семенника и способная, в отличие от зрелых клеток Сертоли извитых канальцев, к активной пролиферации в условиях культуры.

Перитубулярные мышечные клетки – клетки, покрывающие стенку извитого семенного канальца снаружи, обеспечивают сокращение канальца, участвуют в регуляции сперматогенеза и образовании канальцев.

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения,

КС – клетки Сертоли,

СПК – Сертоли-подобные клетки,

FBS – фетальная бычья сыворотка,

ITS – добавка инсулин-трансферрин-селенит,

LIF – лейкемия-ингибирующий фактор роста,

YAC – комплекс низкомолекулярных ингибиторов Y-27632, A-83-01 и CHIR99021,

IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста,

EdU – 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine, аналог тимидина,

KSR –knockout serum replacement, заменитель сыворотки.

ВВЕДЕНИЕ

Клетки Сертоли – популяция соматических клеток в мужских гонадах млекопитающих, поддерживающая сперматогенез и выполняющая комплекс разнообразных функций, таких как питающая, структурная, иммуномодуляторная и другие [1]. КС во взрослом организме дифференцированы, не пролиферируют и не способны к регенерации после повреждений [2-3]. Поэтому неудивительно, что нарушение функционирования или гибель КС являются одной из причин мужского бесплодия [4]. По данным ВОЗ, в мире около 15% пар страдает бесплодием, причем в 50% случаев причиной бесплодия являются нарушения мужской репродуктивной функции [5]. Необструктивная азооспермия, т.е. отсутствие сперматозоидов в эякуляте, обусловленное нарушением сперматогенеза, наблюдается в 10% случаев мужского бесплодия [6]. Как правило, точные причины и механизмы нарушений в таких случаях неизвестны, но часть из них, очевидно, связана с дефектом КС.

Методы лечения этих патологий обычно малоэффективны. Решением могли бы стать различные клеточные технологии, позволяющие поддерживать развитие половых клеток в условиях культуры, такие как воспроизведение сперматогенеза *in vitro* из эмбриональных стволовых клеток или индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, а также дифференцировка имеющихся у пациента половых клеток в клеточной или органной культуре. Существует ряд исследований, проведенных как на лабораторных животных, так и на человеческом материале, которые свидетельствуют о возможности использования таких подходов [6-8]. Во всех этих работах присутствие КС обязательно для полной дифференцировки половых клеток [7]. Это является лимитирующим фактором, так как в случае сперматогенеза *in vitro* или клеточной культуры нужны недифференцированные КС, способные к пролиферации и формированию комплексов с половыми клетками. Такие клетки получают из ткани неонатальных организмов, что неприемлемо с этической точки зрения в случае человека. Дифференцировка половых клеток в органной культуре, то есть в составе фрагмента ткани яичка, также может требовать добавки дополнительных КС, если собственные КС повреждены. Действительно, существуют исследования на лабораторных животных, свидетельствующие о положительном паракринном эффекте КС, инъецированных в интерстициальную ткань яичек с поврежденными собственными КС [9-10], примечательно, что и в этом случае используются недифференцированные КС, полученные от неонатальных животных.

Исследования последней пары десятилетий изменили представление о необратимости дифференцировки КС млекопитающих [11]. Так, была продемонстрирована

частичная дедифференцировка КС в ответ на повышение температуры *in vivo* и *in vitro*, проявляющаяся в разборке гематотестикулярного барьера и появлении маркера недифференцированных клеток кератина 18 [12-14]. Кроме того, было установлено, что КС лабораторных грызунов и человека способны пролиферировать в культуре [15-17]. Однако нами было установлено, что в культуре к активной пролиферации способна лишь минорная популяция Сертоли-подобных клеток (СПК), расположенная в транзитной зоне семенника на границе извитых семенных канальцев и сети семенника, системы сообщающихся полостей и каналов, по которой сперматозоиды транспортируются из семенных канальцев в выносящие каналы и далее в придаток семенника эпидидимис [18]. СПК экспрессируют практически все основные маркеры КС. Однако их отличительной чертой является низкий уровень экспрессии *Dmrt1*, транскрипционного фактора, играющего ключевую роль в дифференцировке и функционировании КС [19-21]. Мы также показали, что эти клетки могут принимать участие в формировании семенных канальцев *de novo* в условиях 3D-культуры. В таких канальцах часть СПК находилась в контакте с половыми клетками, полученными из яичек мышонка [22]. В настоящем проекте нами впервые для коррекции дефектов сперматогенеза *ex vivo* (в органной культуре) планируется использовать популяцию СПК, полученную из яичек взрослых животных, в качестве замены недифференцированных КС. Задача первого этапа проекта –разработка условий культивирования СПК, способствующих их дифференцировке в КС извитых канальцев и продолжительной пролиферации в условиях культуры. Для решения этой задачи были протестированы разные варианты культуральных сред, а также использованы низкомолекулярные ингибиторы Y-27632 (Rho-associated kinase inhibitor), PD0325901 (MAP kinase inhibitor), A-83-01 (type 1 TGF- β receptor inhibitor) и CHIR99021 (GSK-3 inhibitor). Воздействие на клетки этих и других низкомолекулярных веществ является широко распространенной стратегией для культивирования эмбриональных стволовых клеток и получения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, позволяя быстро и обратимо активировать и ингибировать функции специфических белков, ответственных за формирование плюрипотентности [23-24]. Кроме того, этот подход используется и для прогениторных, и даже для дифференцированных клеток. Так, продемонстрировано, что добавление Y-27632, A-83-01 и CHIR99021 к культуре зрелых гепатоцитов способствует их дедифференцировке в прогениторные клетки и позволяет длительно поддерживать последние в культуре, с сохранением их способности к обратной дифференцировке в гепатоциты [25]. В связи с этим, дополнительной задачей стало изучение влияния низкомолекулярных ингибиторов на культуру дифференцированных КС взрослых животных.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Раздел 1. РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНОГО СОСТАВА СРЕДЫ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ СПК.

1.1 Материалы и методы

Для изучения влияния низкомолекулярных ингибиторов Y-27632 (Rho-associated kinase inhibitor), PD0325901 (MAP kinase inhibitor), A-83-01 (type 1 TGF- β receptorinhibitor) и CHIR99021 (GSK-3 inhibitor) на дифференцировку СПК в КС, получали первичную культуру СПК из семенников половозрелых 2-3 мес мышей линии C57Bl/6. Для этого фрагменты семенников, содержащие сеть семенника и прилегающие извитые семенные каналы, обрабатывали сначала коллагеназой IV типа (3 мг/мл) и ДНКазой I типа (0,1 мг/мл) в течение 15 мин, затем трипсином (0,125%) и ДНКазой I типа в течение 10 мин. Полученную клеточную суспензию помещали в культуральные планшеты, покрытые Matrigel, и выращивали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Через 24 ч культуры отмывали от половых клеток. Далее СПК растили в течение 9 сут на средах с разным сочетанием низкомолекулярных ингибиторов, меняя среду каждые вторые сутки. В качестве базовой культуральной среды использовали DMEM:F12 Gluta Max с 1% фетальной бычьей сыворотки (FBS), пируватом натрия, пенициллином/стрептомицином, ростовыми факторами LIF и IGF-1, и инсулином-трансферрином-селенитом (ITS). Оценивали влияние на дифференцировку СПК в культуре следующих факторов: PD0325901 (P, 1 μ M), Y-27632 (Y, 10 μ M), A-83-01 (A, 0,5 μ M) или CHIR99021 (C, 3 μ M), — либо их сочетание: YC или YAC; сыворотки в двух разных концентрациях: 1 % FBS или 10 % FBS, либо заменителей сыворотки: 10 % KSR или 1 % AlbuMAX I Lipid-Rich BSA.

Дифференцировку СПК оценивали по уровню экспрессии Dmrt1, транскрипционного фактора, изначально сниженного в популяции СПК. Образцы культуры фиксировали непосредственно в культуральных планшетах 4% параформальдегидом, промывали фосфатно-солевым буфером, пермеабилizировали 0.5% Тритон X100 и окрашивали первичными антителами к Wt1 и Dmrt1, а затем и соответствующими вторичными антителами. Wt1 является общим маркером СПК и КС, он использовался для идентификации СПК в культуре. Готовые препараты фотографировали на микроскопе Leica DMI6000, анализировали и проводили подсчеты с помощью программного обеспечения Cell Profiler.

1.2 Результаты

Было установлено, что PD0325901 негативно влияет на прикрепление СПК к покрытым Matrigel культуральным чашкам, а также на их рост и жизнеспособность, поэтому этот ингибитор был исключен из дальнейшего анализа. Напротив, добавление к среде Y-27632 (Y) и CHIR99021 (C), по одиночке и вместе, значимо увеличивало долю Dmrt1⁺ СПК по сравнению с базовой средой, а именно: с 2.5±0.9% клеток в базовой среде до 8.1±0.6% на среде с Y, до 14.2±2.5% на среде с C и до 22.2±2.9% на среде с YC (рисунок 1А). Однако дальнейшее увеличение концентрации C в среде вызывало обратный эффект, и кроме того приводило к снижению пролиферации СПК. Добавление к среде A-83-01 (A) само по себе не влияло на уровень Dmrt1 в культуре (доля Dmrt1⁺ клеток равна 3.4±1.2%), однако в сочетании с Y и C, то есть в виде комплекса из трех ингибиторов YAC вызывало значительное увеличение числа Dmrt1⁺ СПК до 33,9±2,3% (рисунок 1А [26]).

Далее было проверено, влияет ли выбор сыворотки или ее заменителя, а также ее концентрация на уровень Dmrt1 в культуре. Для этого было протестировано четыре варианта среды. Все они содержали YAC. Состав одного из вариантов совпадал с базовой средой, то есть в него был добавлен 1% FBS, в другом варианте концентрация сыворотки была увеличена до 10%, в третьем и четвертом вариантах вместо сыворотки использовали ее заменители: 10% KSR (KnockOut Serum Replacement) и 1% AlbuMax (обогащенный липидами бычий сывороточный альбумин), соответственно. Выяснилось, что повышенная концентрация сыворотки или ее замена значимо снижают долю Dmrt1⁺ клеток в культуре до 23.7±2.6, 15.8±0.6 и 4.4±0.9% во втором, третьем и четвертом вариантах среды соответственно (рисунок 1Б [26]). Также было протестировано, как влияют на дифференцировку СПК ростовые факторы LIF и IGF-1 из базовой среды. Оказалось, что доля Dmrt1⁺ СПК увеличивается на среде, не содержащей этих факторов, достигая 50.3±4,5% против 33.9±2.3% на среде с факторами.

Таким образом, установили состав среды культивирования, максимально увеличивающей уровень Dmrt1 в культуре СПК, а именно: DMEM:F12 с добавлением 1% FBS, пирувата натрия, пенициллина/стрептомицина, ITS и YAC.

Необходимо отметить, что культуры СПК с разным уровнем Dmrt1 различались и морфологически. В культурах с небольшим количеством Dmrt1⁺ клеток большинство СПК не имели типичной для эпителиальных клеток полигональной формы и были больше похожи на фибробластоподобные клетки (рисунок 1Д, Е, [26]), в то время как в культурах, высоко экспрессирующих Dmrt1, колонии СПК имели эпителиальную морфологию (рисунок 1В, Г). Кроме того, СПК, поддерживающиеся на среде без YAC,

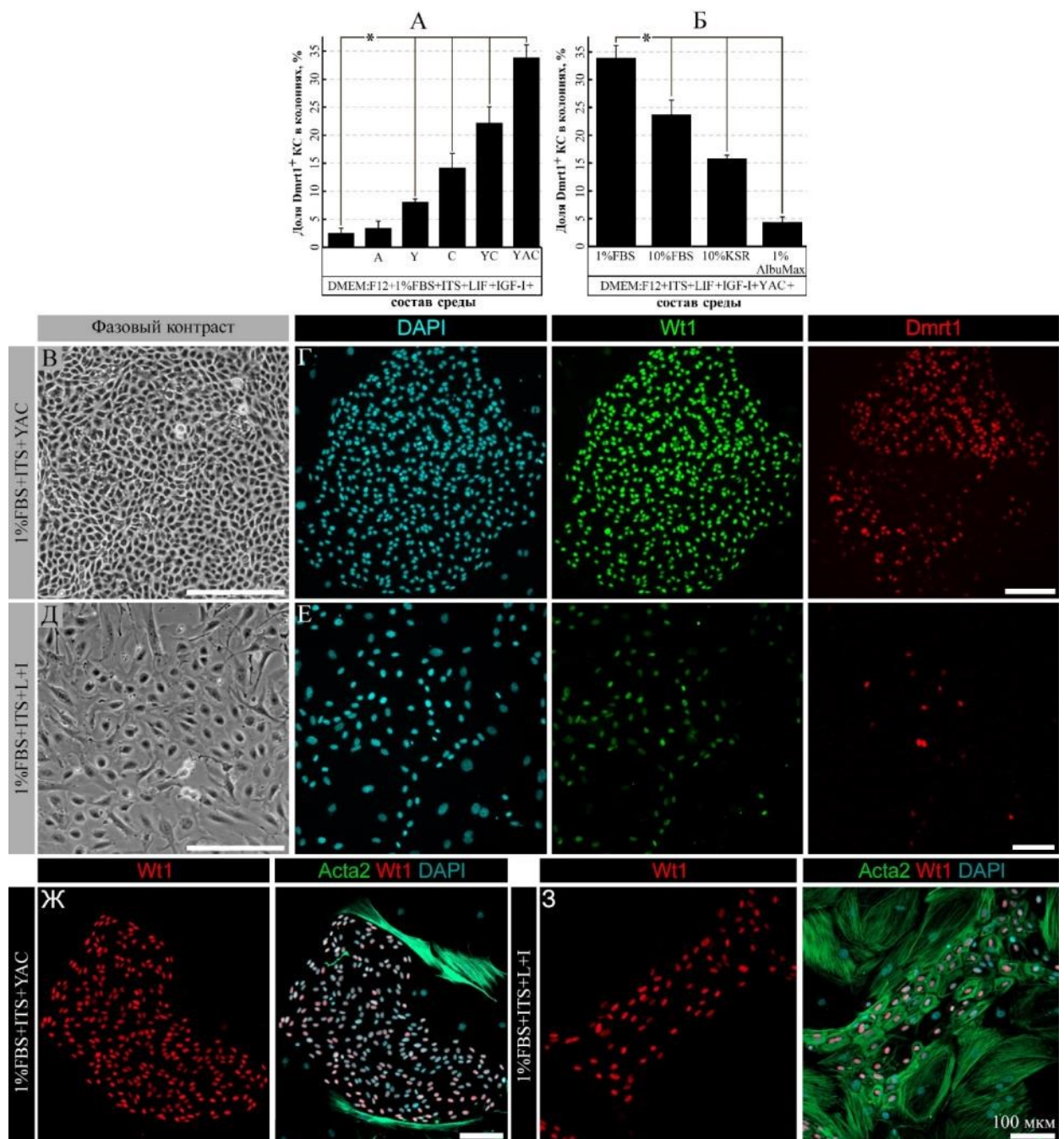


Рисунок 1. Количественная оценка доли Dmr1⁺ клеток в культурах СПК и репрезентативные микрофотографии культур.

А-Б – количество Dmr1⁺ СПК в культурах, полученных от 2-3-мес. мышей, на 9 сут. культивирования в средах различного состава (А-Б). Представлены средние значения от трех независимых экспериментов и стандартные ошибки среднего. * – различия в количестве Dmr1⁺ клеток статистически достоверны при $P \leq 0.05$, здесь и далее непараметрический критерий Манна–Уитни. В, Д – фотографии культур СПК на среде с YAC (В) и без YAC (Д), фазовый контраст. Г, Е, Ж, З – иммунофлуоресцентная окраска культур СПК (Г, Ж – среда с YAC, Е, З – без YAC) на маркеры КС Wt1 и Dmr1 (Г,Е) и Wt1/Acta2 (маркер мезенхимных клеток) (Ж, З) (ядра докрашены DAPI). L – Lif; I – IGF-1.

начиная с 5 сут культуры, начинали экспрессировать альфа-мышечный актин, маркер, не характерный для КС. В то же время СПК на среде с YAC не окрашивались антителами к альфа-актину на протяжении всего срока культивирования (рисунок 1Ж, 3).

Раздел 2. ОЦЕНКА ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ СПК И КС, А ТАКЖЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПАССИРОВАНИЯ.

2.1 Материалы и методы

Для оценки пролиферативной активности СПК к клеткам на 4 и 8 сут культуры за 24 ч до фиксации добавляли аналог тимидина EdU, метящий клетки, находящиеся в S-фазе. После фиксации делали тройную окраску клеток на Wt1, Dmrt1 и EdU. Сравнивали СПК, выращенные на двух вариантах среды: с 1% FBS и YAC, обеспечивающем максимальный уровень Dmrt1, и базовом, 1% FBS без добавления YAC.

Для проверки влияния YAC на долгосрочное культивирование СПК, клетки, поддерживаемые на базовой среде и на среде с YAC, обеспечивающей максимальный уровень Dmrt1, выращивали в первичной культуре в течение 5 или 9 сут, а затем пассивовали в соотношении 1 к 2. Дальнейшее пассивирование осуществляли тогда, когда клетки достигали конфлюэнтного состояния, обычно через каждые 7-10 сут.

Для исследования пролиферативной активности КС из извитых канальцев КС выделяли из фрагментов семенников, не содержащих сеть семенника, по методике, аналогичной той, что использовалась для выделения СПК. Было протестировано два варианта среды, в составе обоих присутствовали DMEM:F12, пируват натрия, пенициллин/стрептомицин, ITS, LIF, IGF-1 и YAC, но в первом случае к среде добавляли 1% FBS, во втором случае – 1% AlbuMax. На 6 сут к культурам добавляли EdU, через 24 ч образцы культур фиксировали и проводили окраску на Wt1 и EdU.

2.2 Результаты

На рисунке 2 А представлен график изменения процента EdU^+ СПК в колониях на 5 и 9 сут, видно, что YAC ингибиторы резко и статистически значимо повышали число клеток в S-фазе клеточного цикла по сравнению с базовой средой (61.8 ± 5.1 и 18.7 ± 0.3 на 5 сут). К 9 сут, когда культуры достигали субконфлюэнтного состояния, показатели пролиферации СПК выравнивались (рисунок 2 А). Также оценивали долю EdU^+ СПК, разделяя их на 3 группы: с высокой, сравнимой с КС из извитых канальцев, экспрессией Dmrt1 ($\text{Dmrt}^{\text{High}}$ -группа), низкой экспрессией (Dmrt^{Low}) и без экспрессии Dmrt1 (Dmrt^{Low}). СПК группы $\text{Dmrt}^{\text{High}}$ отсутствовали в базовой среде на 5 сут культуры и присутствовали лишь в небольшом количестве на 9 сут. На рисунке 2 Б представлен график доли EdU^+ СПК среди СПК с различным уровнем экспрессии Dmrt1.

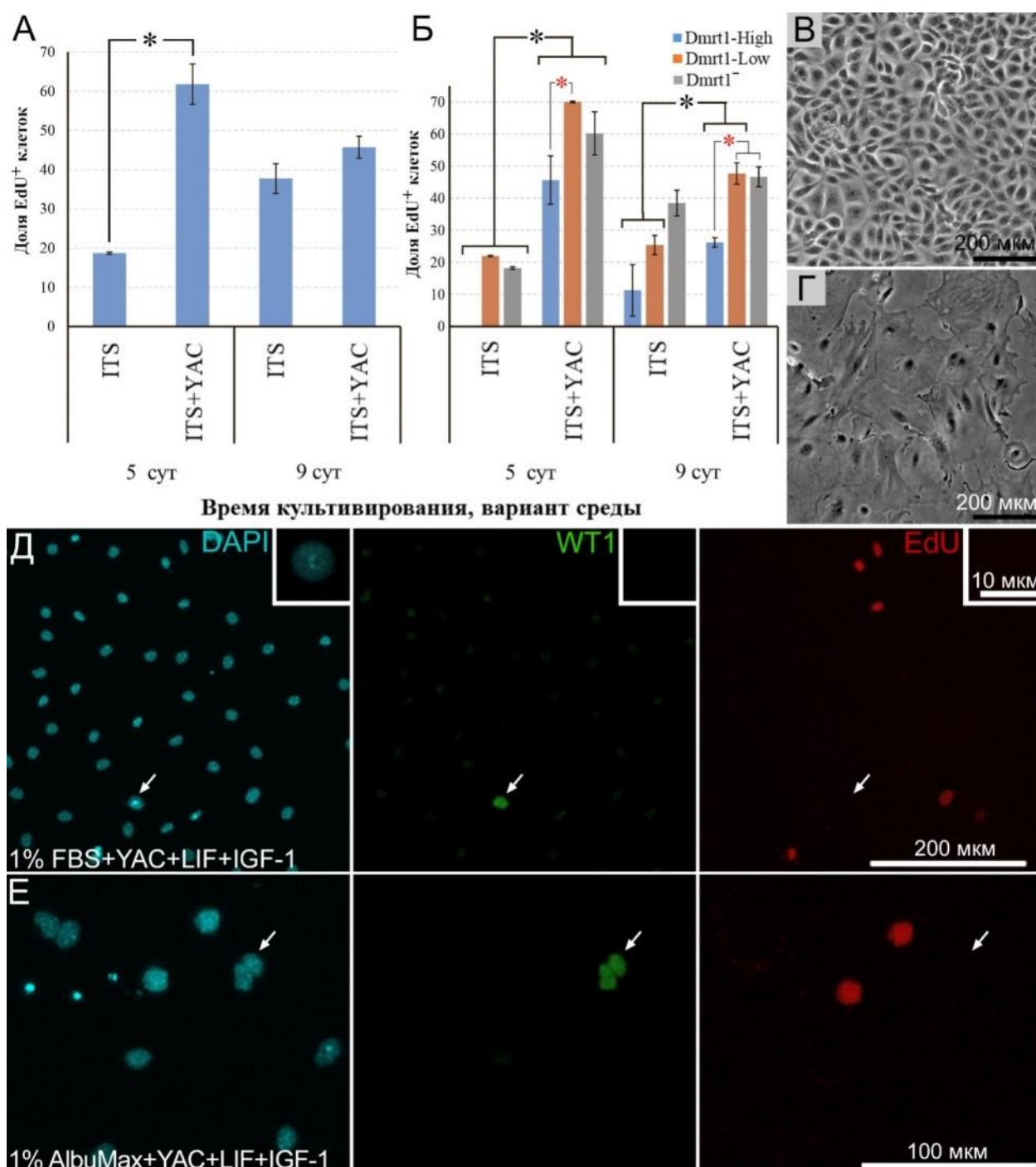


Рисунок 2. Оценка пролиферативной активности СПК и КС на средах различного состава и при длительном культивировании.

А – доля EdU⁺ СПК в культуре. * – отличия от контрольной среды статистически достоверны при $P \leq 0.05$. Б – доля EdU⁺ СПК среди СПК с различным уровнем экспрессии Dmrt1. * – отличия от контрольной среды достоверны при $p \leq 0.05$. * – отличия от группы Dmrt1-High достоверны при $p \leq 0.05$. Представлены средние значения от трех независимых экспериментов и стандартные ошибки среднего. В, Г – фотографии культур СПК 2-3-мес. мышей на среде с YAC, 10 пассаж (В) и без YAC, 3 пассаж (Г), фазовый контраст. Д, Е – Wt1 и EdU в культурах КС извитых канальцев, поддерживающихся на средах различного состава.

Видно, что в культурах с YAC на 5 сут доля пролиферирующих клеток в каждой из популяций была значительно выше, чем в культурах без него. На 9 сут доля Dmrt1⁻ клеток в S-фазе клеточного цикла была одинаковой в обоих вариантах культур, тогда как пролиферативная активность СПК, экспрессирующих Dmrt1 на высоком и низком уровнях, была выше в культурах с добавлением YAC. Таким образом, культуральная среда с ингибиторами поддерживает пролиферацию Dmrt1⁺-СПК дольше, чем среда без ингибиторов. В виду того, что доля пролиферирующих клеток в популяциях Dmrt1^{Low} и Dmrt1⁻ была примерно одинаковой как на среде с YAC, так и без него, можно предположить, что разница в количестве Dmrt1-положительных СПК между культурами возникает из-за того, что в культуре с добавлением YAC по крайней мере часть экспрессирующих Dmrt1 СПК возникает *de novo* из популяции клеток, первоначально не экспрессирующих Dmrt1 и начинающих его экспрессировать в процессе культивирования. Обращает на себя внимание также тот факт, что в то время как пролиферативные активности Dmrt1^{Low}- и Dmrt1⁻-клеток не различались между собой в культурах с добавлением YAC как на 5, так и на 9 сут, пролиферативная активность Dmrt1^{High}-клеток всегда была ниже. Снижение пролиферативной активности в группе наиболее высоко экспрессирующих Dmrt1 СПК, скорее всего, является следствием дифференцировки этих клеток в культуре, которые, как и дифференцирующиеся КС, постепенно выходят из клеточного цикла.

Исследование длительного культивирования СПК установило, что добавление к среде YAC позволяет культивировать СПК, по крайней мере, в течение 10 пассажей (двух месяцев), в то время как на среде без ингибиторов пассировать культуру СПК удавалось максимум 3-4 пассажа (рисунок 2 В, Г). Как видно из рисунка 2 В, даже на последнем пассаже клетки на среде с YAC сохраняли высокую пролиферативную активность и типичную морфологию эпителиальных клеток. Напротив, на среде без YAC СПК уже на 3-м пассаже значительно увеличивались в размерах, имели неправильную форму и местами теряли контакт между соседними клетками (рисунок 2 Г). Анализ экспрессии Dmrt1 культивируемыми СПК показал, что уровень Dmrt1 в клетках оставался высоким до 3-4 пассажа ($39.4 \pm 2.1\%$ Dmrt1⁺ СПК), а затем снижался и на 9-м пассаже составлял лишь $8.3 \pm 0.3\%$. Мы предполагаем, что снижение доли Dmrt1⁺-клеток в процессе пассирования может быть связано с дифференцировкой и выходом из клеточного цикла СПК с наиболее высоким уровнем экспрессии этого фактора, в то время как клетки, не экспрессирующие Dmrt1, сохраняют пролиферативную активность на прежнем уровне. На следующем этапе проекта мы планируем продолжить работы в направлении увеличения числа Dmrt1⁺-СПК в процессе длительного культивирования за

счет обогащения разработанной нами среды другими факторами, применяемыми в частности, для культивирования стволовых и прогениторных клеток.

Также были проведены дополнительные эксперименты по культивированию на среде с YAC дифференцированных КС, так как, по данным литературы, добавление в среду этих ингибиторов способствует дедифференцировке и пролиферации другого типа дифференцированных клеток – гепатоцитов [25]. Установили, что ни один из вариантов среды (с YACи без) не привел к повышению пролиферации КС: в обоих случаях эти клетки были малочисленны и не включали EdU-метку, то есть находились вне клеточного цикла (рисунок 2 Д, Е), в культуре активно делились только перитубулярные мышечные ($Wt1^{-}$)-клетки [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На первом этапе проекта разработана среда культивирования, способствующая дифференцировке СПК в сторону КС. Состав среды следующий: DMEM:F12 с добавлением 1% FBS, пирувата натрия, пенициллина/стрептомицина, ITS и YAC. Ключевым компонентом среды является комплекс низкомолекулярных ингибиторов YAC. Среда с YAC способствует сохранению высокой пролиферативной активности СПК, эпителиальной морфологии и позволяет длительно культивировать эти клетки. В то же время добавление YAC к выделенным в культуру дифференцированным КС не приводит к их выходу из дифференцированного состояния.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Sertoli Cell Biology; Eds Skinner M.K., Griswold M.D. – San Diego and London: Elsevier Academic Press – 2005. – 512 P.
2. Sharpe R.M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood // *Reproduction* – 2003. – Vol. 125, № 6. – P. 769 – 784.
3. Malolina E.A., Kulibin A.Yu., Naumenko V.A., Gushchina E.A., Zavalishina L.E., Kushch A.A. Herpes simplex virus inoculation in murine rete testis results in irreversible testicular damage // *International Journal of Experimental Pathology* – 2014. – Vol. 95. – P. 120 – 130.
4. Salameh W.A., Swerdloff R.S. Conditions affecting Sertoli cells. In *Sertoli Cell Biology*; Eds Skinner M.K., Griswold M.D. – San Diego and London: Elsevier Academic Press – 2005. – P. 383 – 413.
5. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R., Kopa Z., Krausz C., Tournaye H. Guidelines on Male Infertility: European Association of Urology – 2016. Url.: <http://www.uroweb.org/guidelines/online-guidelines>.
6. Yang S., Ping P., Meng M., Li P., Tian R. et al. Generation of haploid spermatids with fertilization and development capacity from human spermatogonial stem cells of cryptorchid patients // *Stem Cell Reports* – 2014. – Vol. 3, № 4. – P. 663 – 675.
7. Saitou M., Miyauchi H. Gametogenesis from Pluripotent Stem Cells // *Cell Stem Cell* – 2016. – Vol. 18, № 6. – P. 721 – 735.
8. Zhou Q., Wang M., Yuan Y., Wang X., Fu R., Wan H. Complete meiosis from embryonic stem cell-derived germ cells in vitro // *Cell Stem Cell* – 2016. – Vol. 18, № 3. – P. 330 – 340.
9. Zhang Z., Shao S., Shetty G., Meistrich M.L. Donor Sertoli cells transplanted into irradiated rat testes stimulate partial recovery of endogenous spermatogenesis // *Reproduction* – 2009. – Vol. 137. – P. 497 – 508.
10. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А., Яцек С.П., Жамынчиев Э.К., Кузин Г.В. Восстановление сперматогенеза после экспериментального двустороннего абдоминального крипторхизма путем аллогенной трансплантации недифференцированных клеток Сертоли // *Урология* – 2015. № 6. – С. 74–81.
11. Tarulli G.A., Stanton P.G., Meachem S.J. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? // *Biology Reproduction* – 2012. – Vol. 87. – P. 1 – 11.
12. Zhang Z.H., Hu Z.Y., Song X.X., Xiao L.J., Zou R.J., Han C.S., Liu Y.X. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism // *Internal Journal Andrology* – 2004. – Vol. 27. – P. 234 – 239.

13. Zhang X.S., Zhang Z.H., Jin X., Wei P., Hu X.Q., Chen M., Lu C.L., Lue Y.H., Hu Z.Y., Sinha Hikim A.P., Swerdloff R.S., Wang C., Liu Y.X. Dedifferentiation of adult monkey Sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase 1/2 induced by heat treatment//Endocrinology – 2006. – Vol. 147. – P. 1237 – 1245.
14. Guo J., Tao S.X., Chen M., Shi Y.Q., Zhang Z.Q., Li Y.C., Zhang X.S., Hu Z.Y., Liu Y.X. Heat treatment induces liver receptor homolog-1 expression in monkey and rat Sertoli cells//Endocrinology – 2007. – Vol. 148 – P. 1255 – 1265.
15. Ahmed E.A., Barten-van Rijbroek A.D., Kal H.B., Sadri-Ardekani H., Mizrak S.C., van Pelt A.M., de Rooij D.G. Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells//Biology Reproduction – 2009. – Vol. 80 – P. 1084 – 1091.
16. Nicholls P.K., Stanton P.G., Chen J.L., Olcorn J.S., Haverfield J.T., Qian H., Walton K.L., Gregorevic P., Harrison C.A. Activin signaling regulates Sertoli cell differentiation and function//Endocrinology – 2012. – Vol. 153. – P. 6065 – 6077.
17. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А. Характеристика культуры клеток Сертоли в условиях повышенной температуры и гипоксии//Цитология. – 2013. – Т. 55, № 11. – С. 788–797.
18. Kulibin A.Y., Malolina E.A. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture//Reproduction – 2016. – Vol. 152, №4 – P. 271 – 281.
19. Raymond C.S., Murphy M.W., O'Sullivan M.G., Bardwell V.J., Zarkower D. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation//Genes Development – 2000. – Vol. 14. – P. 2587 – 2595.
20. Matson C.K., Murphy M.W., Sarver A.L., Griswold M.D., Bardwell V.J., Zarkower D. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis//Nature – 2011. – Vol. 476 – P. 101 – 104.
21. Zarkower D. DMRT genes in vertebrate gametogenesis//Current Topics in Development Biology – 2013. – Vol. 102. – P. 327 – 356.
22. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А. Характеристика минорной популяции активно пролиферирующих в культуре клеток Сертоли из транзитной зоны яичка взрослых мышей//Молекулярная медицина – 2017. – Т. 15, № 6. – С. 28 – 31.
23. Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K., Ge J., Xu J., Zhang Q., Zhao Y., Deng H. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds//Science – 2013. – Vol. 341, №6146. – P. 651 – 654.
24. Tsutsui H., Valamehr B., Hindoyan A., Qiao R., Ding X., Guo S., Witte O.N., Liu X., Ho C.M., Wu H. An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term

- maintenance of human embryonic stem cells//Nature Communication – 2011. – Vol. 2. – P. 167.
25. Katsuda T., Kawamata M., Hagiwara K., Takahashi R.U., Yamamoto Y., Camargo F.D., Ochiya T. Conversion of terminally committed hepatocytes to cultura blebipotent progenitor cells with regenerative capacity//Cell Stem Cell – 2017. – Vol. 20, № 1. – P. 41 – 55.
26. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А. Комплекс низкомолекулярных ингибиторов YAC увеличивает уровень экспрессии Dmrt1 в клетках Сертоли транзитной зоны семенника мыши в культуре//Гены и клетки – 2018. – Т. 14. № 3. – С. 75 – 81. DOI: 10.23868/201811037. (РИНЦ)
27. Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Проллиферативная активность клеток Сертоли извитых семенных канальцев мыши//Цитология – 2018. –Т. 60. №4. – С.308 – 315. DOI:10.31116/tsitol.2018.04.09. (РИНЦ)

ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ГЗ 0108-2018-0012 ЗА 2018 ГОД

*отчетные публикации

1. ***Малолина Е.А., Кулибин А.Ю.** Пролиферативная активность клеток Сертоли извитых семенных канальцев мыши//Цитология – 2018. –Т. 60. №4. – С.308 – 315. DOI:10.31116/tsitol.2018.04.09. (РИНЦ)
2. ***Кулибин А.Ю., Малолина Е.А.** Комплекс низкомолекулярных ингибиторов YAC увеличивает уровень экспрессии Dmrt1 в клетках Сертоли транзиторной зоны семенника мыши в культуре//Гены и клетки – 2018. – Т. 14. № 3. – С. 75 – 81. DOI: 10.23868/201811037. (РИНЦ)

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН, протокол № 11 от 28 ноября 2018 г.