

ПОВЫШЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИОННОГО ПОТЕНЦИАЛА КЛЕТОК СЕРТОЛИ ВСЛЕДСТВИЕ ТЕПЛОВОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ

Е.А. Малолина¹, А.Ю. Кулибин², кандидат биологических наук

¹ФГБУ Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д.И. Ивановского Минздрава РФ

²ФГБУ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

E-mail: Kulibin.A.VKRJ@gmail.com

Клетки Сертоли (КС), в норме высокодифференцированные клетки, поддерживающие сперматогенный процесс, после теплового воздействия приобретают ряд черт, характерных для недифференцированных неонатальных КС. Было предположено, что КС мышей при экспериментальном крипторхизме, приводящем к повышению температуры внутри семенников, разделяет с неонатальными КС такое свойство, как высокий регенерационный потенциал. Для проверки этого предположения проведена трансплантация клеток семенников, полученных от крипторхидных трансгенных мышей линии Rosa26, в семенники инфертильных мышей с поврежденными собственными КС. Установлено, что при трансплантации КС, подвергшиеся тепловому воздействию, не только формируют новые семенные каналцы и заселяют базальную мембрану каналцев реципиента, но и способны поддерживать сперматогенез; общее число новообразованных структур при введении в семенные каналцы составляет 16,1 структуры на срез, при инъекции в интерстиций — 8,0. В качестве контроля проведена трансплантация клеток семенников интактных половозрелых мышей; общее число структур, образованных КС интактных мышей, было значительно меньше: 1,3 — при введении в каналцы, 0 — при инъекции в интерстиций. Специфичность теплового воздействия подтверждает тот факт, что КС, выделенные от мышей после другого воздействия (введения бусульфана, как и крипторхизм, нарушающего сперматогенез и изменяющего транскриптом КС), при трансплантации по морфогенетическому потенциалу оставались на низком уровне, уровне интактных КС (2,4 — при введении в каналцы и 0,4 — при инъекции в интерстиций). Также впервые нами обнаружена экспрессия цитокератина-18 (маркера недифференцированных КС) в КС крипторхидных мышей, но не мышей, подвергшихся воздействию бусульфана. Полученные данные свидетельствуют о связи высокого регенерационного потенциала КС, подвергшихся тепловому воздействию, с их дедифференцировкой.

Ключевые слова: клетки Сертоли, регенерационный потенциал, тепловое воздействие, крипторхизм, восстановление сперматогенеза, цитокератин-18

HEAT TREATMENT ENHANCES REGENERATION CAPACITY OF SERTOLI CELLS

E. A. Malolina¹, A. Yu. Kulibin²

¹Federal State Budgetary Institution «Research Institute of Virology named after D.I. Ivanovsky» of the Ministry of Health Care and Social Development

²Federal State Budgetary Institution of Science «Koltzov Institute of Developmental Biology» of the Russian Academy of Sciences

Sertoli cells are the primary cells that support developing spermatogenic cells in the seminiferous tubules. Heat treatment induces a reversible change in the Sertoli cells (SC) from the mature differentiated state to an immature-like dedifferentiated state. We suggested that under experimental bilateral cryptorchidism (type of heat treatment) SC in adult mice differ from neonatal dedifferentiated SC according to high regeneration capacity. To confirm this suggestion we transplanted testis cells from adult cryptorchid transgenic mice line ROSA26-B6 into testes of infertile mice with damaged endogenous SCs. We demonstrated that after transplantation SC from cryptorchid mice not only generate new seminiferous tubules and reestablish Sertoli cells on the basement membrane of host seminiferous tubules, but also can support spermatogenesis; the total number of new structures after the testis cell injection into seminiferous tubules and the interstitium is 16.1 and 8.0 structures per histological section, respectively. Testis cells from adult wild-type mice were transplanted as a control; the total number of new structures was significantly less than after cryptorchid testis cell injection (1.3 and 0 after transplantation into seminiferous tubules and the interstitium respectively). Furthermore specificity of heat treatment was confirmed by transplantation testis cells from busulfan-treated mice. Busulfan treatment destroys germ cells and alters transcriptomes of SC like cryptorchidism. However SC from busulfan-treated mice have low regeneration capacity like adult wild-type donor cells (the total number of new structures is 2.4 and 0.4 after injection into seminiferous tubules and the interstitium, respectively). Also we found that a marker of immature SC — cytokeratin 18 re-expressed in the cells of the adult mice cryptorchid testes. It is an additional evidence for relation between heat-induced high regeneration capacity of Sertoli cells and their dedifferentiation.

Key words: Sertoli cell, regeneration capacity, heat treatment, cryptorchidism, restoration of spermatogenesis, cytokeratin 18

ВВЕДЕНИЕ

Клетки Сертоли (КС) — соматические клетки семенника, поддерживающие развитие половых клеток. КС являются основой структуры семенных

каналцев, источником многих факторов роста и дифференцировки для половых клеток, выполняют трофическую функцию и др. Без этих клеток развитие половых клеток невозможно.

Поддерживать развитие половых клеток способны только полностью дифференцированные КС; их дифференцировка завершается в препубертатном периоде развития организма, незадолго до наступления половозрелости [15]. Однако дифференцировка КС – обратимый процесс. Так, в ряде работ было показано, что КС у разных животных приобретают ряд черт недифференцированных неонатальных КС в ответ на повышение температуры семенников, которое вызывают их локальным кратковременным нагреванием (тепловой шок) или фиксацией в брюшной полости (экспериментальный крипторхизм). В обоих случаях тепловое воздействие вызывает апоптоз половых клеток и остановку их развития на стадии мейоза [9]; КС начинают экспрессировать маркер недифференцированных предшественников – цитокератин-18, в них активируются сигнальные пути, характерные для неонатальных КС (ERK1/2-киназный каскад) [5, 18–20], в ряде случаев нарушается гематотестикулярный барьер [8]. Чаще эти изменения КС обратимы, т.е. после снижения температуры до нормы КС вновь приобретают все черты дифференцированных клеток, а сперматогенез восстанавливается [16, 20].

Вопрос, насколько далеко заходит дедифференцировка КС при упомянутых выше экспериментальных воздействиях, приобретают ли такие клетки все черты своих предшественников, остается открытым. Так, известно, что неонатальные КС обладают высокими регенерационными потенциями. При трансплантации как в семенники с поврежденными собственными КС [14], так и эктопически – под кожу, под капсулу почки [7] – неонатальные КС формируют новые каналцы (НК), дифференцируются и способны поддерживать сперматогенез. Дифференцированные КС половозрелых животных такими способностями не обладают [14].

Ранее мы показали [1], что при трансплантации в семенники мышей, опустошенные от собственных половых клеток и КС, полученные от крипторхидных мышей КС способны приживаться и образовывать там НК. Эти данные поставили ряд новых вопросов: способны ли пересаженные КС поддерживать развитие мужских половых клеток; трансплантированные КС по регенерационному потенциалу ближе к КС мышонка или к КС половозрелого интактного животного; наконец, специфично ли повышение регенерационного потенциала для теплового воздействия? Так, нельзя а priori исключить, что любое нарушение сперматогенеза изменяет статус дифференцировки КС и повышает их регенерационные потенции. Например, введение цитотоксического препарата бусульфана приводит к гибели половых клеток, что, в свою очередь, резко изменяет экспрессию многих генов в КС [12] и теоретически может способствовать повышению их способности к регенерации.

Целью данной работы было изучение регенерационного потенциала КС после теплового воздействия,

вызванного экспериментальным крипторхизмом, при их трансплантации в семенники, опустошенные от собственных половых клеток и КС.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе в качестве реципиентов для трансплантации использовали самцов мышей линии C57Bl/6 (23 самца), а в качестве доноров – трансгенных мышей-самцов линии Rosa26 (20 самцов) на основе C57Bl/6, экспрессирующих во всех клетках репортерный ген LacZ. Мышей содержали в стандартных условиях вивария с режимом день-ночь 12/12 ч; воду и корм животные получали *ad libitum*.

Подготовка мышей-реципиентов. У 3–4-месячных самцов мышей C57Bl/6 нарушали сперматогенез (рис. 1а, норма) последовательным введением бусульфана и сульфата кадмия по описанной ранее методике [14]. Цитотоксический препарат бусульфан (Sigma, США), избирательно поражающий в семеннике сперматогониальные стволовые клетки (ССК), вводили внутрибрюшинно в дозе 45 мг/кг. Через 1 мес в семенниках не оставалось половых клеток (рис. 1б). В такие семенники, непосредственно в семенные каналцы, вводили по 15 мкл раствора сульфата кадмия (Sigma) в концентрации 0,46 мг/мл (по методике, описанной ниже). Через 14 сут после инъекции сульфата кадмия, поражающего КС, в семеннике оставались остовы семенных каналцев, практически лишенные как половых, так и соматических клеток (рис. 1г). На этот период в семенники мышей-реципиентов инъецировали клетки от мышей-доноров.

Подготовка мышей-доноров. Было выполнено 4 варианта трансплантации клеток и использовано, соответственно, 4 группы мышей-доноров: 1-я – мыши, подвергшиеся в 3–4-месячном возрасте операции билатерального крипторхизма; 2 контрольные группы – «положительный контроль» (2-я группа) – 2-суточные мышата, КС которых обладают высокой регенерационной активностью, и «отрицательный контроль» (3-я группа) – интактные 3–4-месячные мыши, КС которых не способны к регенерации [14]. В 4-й группе были 3–4-месячные самцы, подвергшиеся воздействию бусульфана (1 мес после введения бусульфана в дозе 45 мг/кг).

Билатеральный крипторхизм мышам-донорам выполняли по методике, описанной ранее [13]; перед проведением операции животных наркотизировали хлоралгидратом (Sigma) в дозе 400 мг/кг. Суспензию клеток семенников от таких мышей выделяли через 45 сут после операции, когда изменения в семенниках, вызванные крипторхизмом, становились максимальными (рис. 1б).

Получение суспензии клеток для трансплантации. Мышей-доноров забивали дислокацией шейных позвонков (2-суточных мышат – декапитацией), выделяли их семенники и помещали в раствор Хэнкса (ПанЭко, Россия). Суспензию клеток семенников

получали, инкубируя семенники в коллагеназе IV (0,7 мг/мл) и ДНКазе I (0,04%) (Sigma), а затем в растворе трипсина (0,25%) с 1 мМ ЭДТА (Sigma) (по 15 мин, при температуре 37°C). Полученную клеточную суспензию пропускали через фильтры с размером пор 200–300 и 40 мкм (GE Osmonics, США) и осаждали центрифугированием при 400 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в среде α MEM/F12 (ПанЭко). В семенники мышей-реципиентов клетки семенников вводили в среде α MEM/F12, содержащей 2,5% FBS, 0,2% ДНКазы I, так, чтобы число КС в объеме, вводимом в семенник (25 мкл), было одинаковым во всех 4 вариантах трансплантации ($6,3 \cdot 10^5$ кл/семенник реципиента).

Определение содержания КС в клеточных суспензиях. Суспензии клеток семенников разводили из расчета 10^6 клеток на 100 мкл. Клетки инкубировали в растворе первичных кроличьих поликлональных антител к маркеру КС – белку опухоли Вилмса Wt1 [10] (LifeSpan Biosciences, США), в качестве вторичных антител использовали anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 conjugated (Invitrogen). Процент Wt1⁺-клеток подсчитывали, просматривая препараты на флюоресцентном микроскопе Olympus IX51 (Япония).

Трансплантации клеточных суспензий. В каждом варианте трансплантации суспензии клеток семенников доноров (по 25 мкл на семенник) вводили в семенники мышей-реципиентов 2 способами: в интерстиций, т.е. в ткань между семенными канальцами, и непосредственно в семенные канальцы. В каждой из 8 получившихся таким образом групп клетки были трансплантированы в 3–5 семенников. Мышей-реципиентов наркотизировали хлоралгидратом, выводили семенники в разрез кожи и брюшины. В случае введения клеток в интерстиций прокалывали белочную оболочку семенника, в отверстие вводили стеклянный капилляр, соединенный с поршневым инъектором, и инъецировали жидкость между канальцами. При введении клеток в семенные канальцы использовали ранее разработанную методику [10]: капилляр вводили в выносящий каналец и по нему – в сеть семенника, из которой жидкость расходилась по семенным канальцам.

Анализ результатов трансплантаций. Мышей-реципиентов забивали дислокацией шейных позвонков на 45-е сутки после трансплантации. Семенники выделяли и окрашивали тотально для выявления продукта трансгена LacZ фермента β -галактозидазы (β -Gal) по методике, описанной ранее [10]. Семенники заливали в парафин и с каждого готовили серии срезов толщиной 7 мкм. На полученных срезах цитоплазма донорских клеток была окрашена в ярко-синий цвет, ядра клеток и цитоплазму клеток реципиента докрашивали нейтральным красным в светло-красный цвет. Срезы просматривали под микроскопом Leica STR5000. Выделяли несколько типов структур, образуемых КС доноров: НК, а также скопления КС в ин-

терстиции и в семенных канальцах реципиента, КС на базальной мембране семенных канальцев реципиента; отмечали присутствие в этих структурах половых клеток. На каждом 10-м срезе семенников подсчитывали количество структур различных типов.

Выявление экспрессии цитokerатина-18. Для иммунофлюоресцентного анализа брали семенники у крипторхидных мышей на 14-е и 45-е сутки после операции, а у мышей, подвергшихся воздействию бусульфана – через 1 мес. Готовили тотальные препараты семенных канальцев и инкубировали их с первичными кроличьими моноклональными антителами к цитokerатину-18 (Millipore, США), в качестве вторичных антител использовали anti-rabbit IgG Alexa Fluor 488 conjugated (Invitrogen, США). Ядра клеток докрашивали пропидия йодидом (Sigma). Препараты просматривали и фотографировали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 STED (США).

Статистический анализ результатов. Количество структур, образуемых трансплантированными

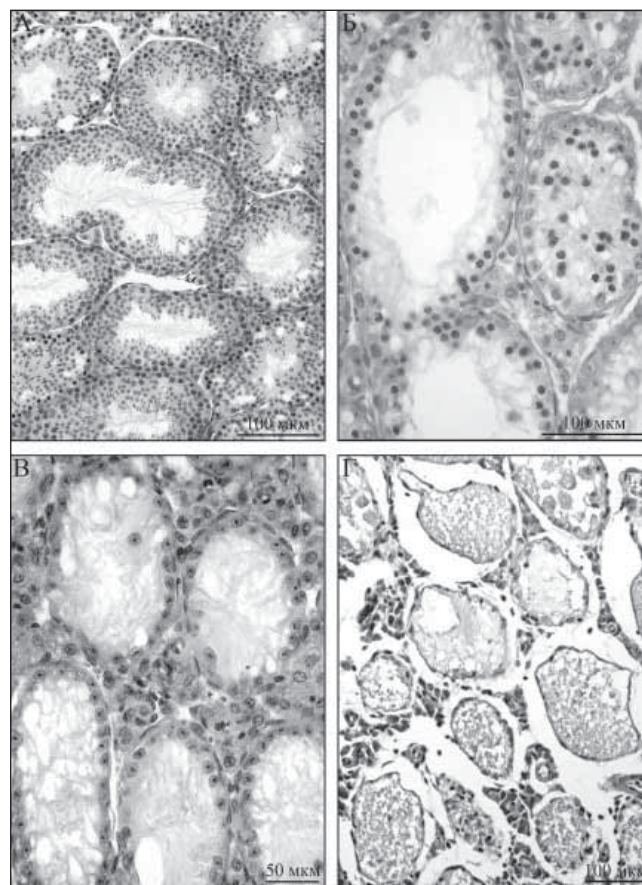


Рис. 1. Поперечные срезы семенных канальцев: а – интактный семенник половозрелого самца; б – после 45 сут искусственного крипторхизма; в – через 1 мес после введения бусульфана, в канальцах остаются только КС; г – через 2 нед после последующего введения в семенные канальцы сульфата кадмия; остаются лишь их остовы, заполненные клеточным дебрисом. Окраска гематоксилином и эозином

клетками в семенниках реципиентов, выражали в виде среднего числа в расчете на 1 срез. Для этого в каждой контрольной и экспериментальной группах было проанализировано от 120 до 270 срезов. Сравнение средних значений в контрольных и экспериментальной выборках проводили с использованием параметрического критерия Стьюдента (t-критерий) в статистическом пакете STATISTICA 8.0.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение содержания КС в суспензиях клеток семенников. Для выравнивания числа трансплантируемых КС в 4 вариантах трансплантации была определена концентрация КС в суспензиях клеток семенников 4 групп доноров. КС в суспензии идентифицировали иммунофлюоресцентным методом по окраске на Wt1, белок – маркер КС [11], экспрессия которого не исчезает при воздействиях, использованных в данной работе. По результатам подсчета числа Wt1⁺-клеток в суспензиях клеток семенников были рассчитаны общие концентрации инъектируемых клеток для всех вариантов трансплантации. Они составили: для суспензий клеток семенников половозрелых intactных мышей – $3 \cdot 10^8$ кл/мл (содержание КС в суспензии 8,4%), 2-суточных мышат – $4,26 \cdot 10^7$ (59,2%), мышей после 45 сут билатерального крипторхизма – $6,3 \cdot 10^7$ (40%), мышей через 1 мес после инъекции бусульфана – $3,82 \cdot 10^7$ кл/мл (65%).

Количественный анализ результатов трансплантаций. Во всех 4 вариантах трансплантации общее число всех структур, образуемых КС донора в семенниках реципиентов (НК, КС на базальной мембране,

скопления КС), в расчете на срез было достоверно выше ($p \leq 0,05$) при инъекции клеточной суспензии в каналцы, чем при инъекции в интерстиций (рис. 2). В случае введения и в каналцы, и в интерстиций больше всего структур было в положительном контроле, где донорами являлись 2-суточные мышата ($58,8 \pm 3,23$ и $17,4 \pm 1,02$ структур соответственно), промежуточное положение занимала экспериментальная группа, где донорами были крипторхидные мыши ($16,1 \pm 0,81$ и $8 \pm 0,44$), значительно меньше структур, образованных клетками донора, было в той группе, где донорами являлись мыши, обработанные бусульфаном ($2,4 \pm 0,23$ и $0,4 \pm 0,06$); наконец, самые низкие показатели были в отрицательном контроле, у половозрелых intactных мышей ($1,3 \pm 0,18$ и 0); все различия достоверны при $p \leq 0,05$ (см. рис. 2).

При трансплантации суспензий клеток, полученных от 2-суточных мышат и крипторхидных мышей, преобладающим типом структур, образуемых КС донора, были НК (рис. 3). Их число в расчете на срез в положительном контроле при трансплантации в каналцы составило $47,1 \pm 4,45$, в интерстиций – $11,7 \pm 0,74$, в экспериментальной группе – соответственно $11,2 \pm 0,61$ и $5,4 \pm 0,35$. В случае введения клеток в каналцы 2-м по распространенности типом донорских структур были группы КС, располагающиеся на базальной мембране опустошенных каналцев реципиента: в положительном контроле их число составило $11,7 \pm 0,9$ в расчете на срез, в экспериментальной группе – $4,7 \pm 0,35$; скопления КС в просвете семенных каналцев реципиентов встречались редко. В случае инъекций в интерстиций, напротив, скопления КС встречались часто: в положительном контроле их было $5,7 \pm 0,35$ в расчете на срез, в экспериментальной – $2,3 \pm 0,1$. В группе, где донорами являлись мыши, обработанные бусульфаном, при введении в каналцы КС либо находились в скоплениях, либо прикреплялись к базальной мембране; и те, и другие структуры встречались крайне редко (соответственно $1,3 \pm 0,14$ и $1,1 \pm 0,13$). При введении в интерстиций они образовали небольшое количество скоплений ($0,3 \pm 0,04$) и НК ($0,1 \pm 0,02$). В отрицательном контроле в случае инъекции клеток в каналцы было найдено лишь небольшое число НК ($1,2 \pm 0,18$), совсем редко попадались скопления КС ($0,1 \pm 0,03$); в случае инъекции клеток в интерстиций структур, образованных клетками донора, не найдено (см. рис. 3).

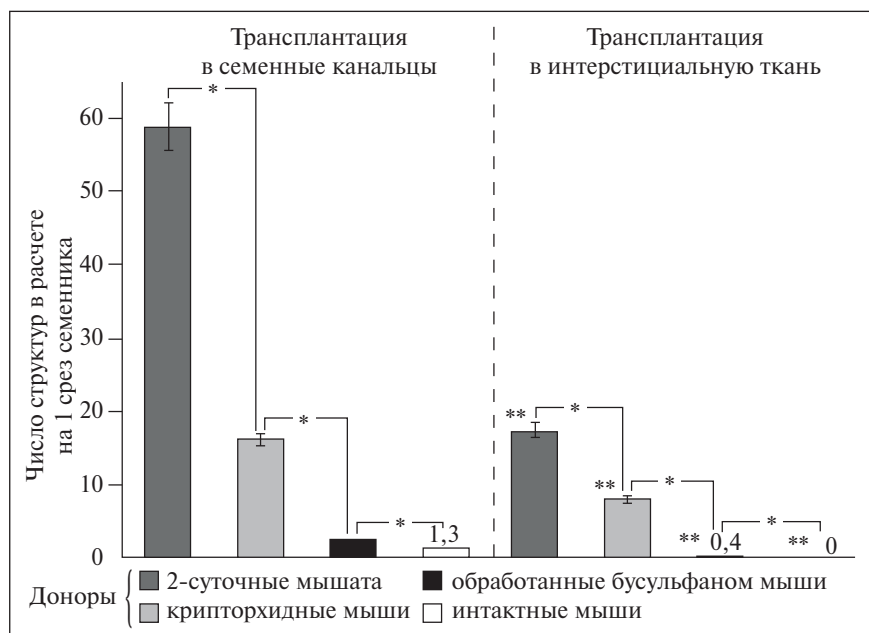


Рис. 2. Общее число образуемых трансплантированными КС структур в семенниках реципиентов (в расчете на 1 срез семенника; $M \pm m$).

* – различия достоверны ($p \leq 0,05$): одна звездочка – между группами, две звездочки – между двумя способами инъекций

При анализе результатов трансплантации учитывали также половые клетки, находящиеся в структурах, образованных КС донора. При введении клеток в каналцы половые клетки присутствовали: в положительном контроле – в $24 \pm 2,18$ НК в расчете на срез и в $3,8 \pm 0,37$ участках базальной мембраны с донорскими КС; в экспериментальной группе – в $0,2 \pm 0,03$ НК и в $0,4 \pm 0,05$ участках базальной мембраны; в группе, где донорами являлись мыши, обработанные бусульфаном, и в отрицательном контроле половых клеток не обнаружено (см. рис. 3). При трансплантации в интерстиций половые клетки были обнаружены только в экспериментальной группе, в остальных же группах их не было вообще.

Качественный анализ результатов трансплантации. При внутриканальцевой трансплантации суспензии клеток семенников 2-суточных мышат через 1,5 мес клетки донора были обнаружены во множестве семенных канальцев реципиента, как

правило, располагающихся в несколько рядов по периферии семенника. Канальцы, содержащие клетки донора, часто охватывали большую часть поверхности семенника (рис. 4а). Иногда наблюдались каналцы (рис. 4б), размеры которых значительно превышали таковые в семеннике в норме (на рис. 4в для сравнения представлен поперечный срез канальца интактного 2–3-месячного самца С57ВL/6 в том же масштабе). В таких канальцах по периферии можно было наблюдать формирование трансплантированными КС сразу нескольких НК (рис. 4б, д). КС доноров располагались также на базальной мембране канальцев реципиента. Развитие половых клеток доноров наблюдали как в НК (рис. 4е), так и на базальной мембране старых канальцев рядом с трансплантированными КС (рис. 4е), в некоторых случаях дифференцировка половых клеток доходила до завершающей стадии – стадии удлиняющихся сперматид (рис. 4ж).

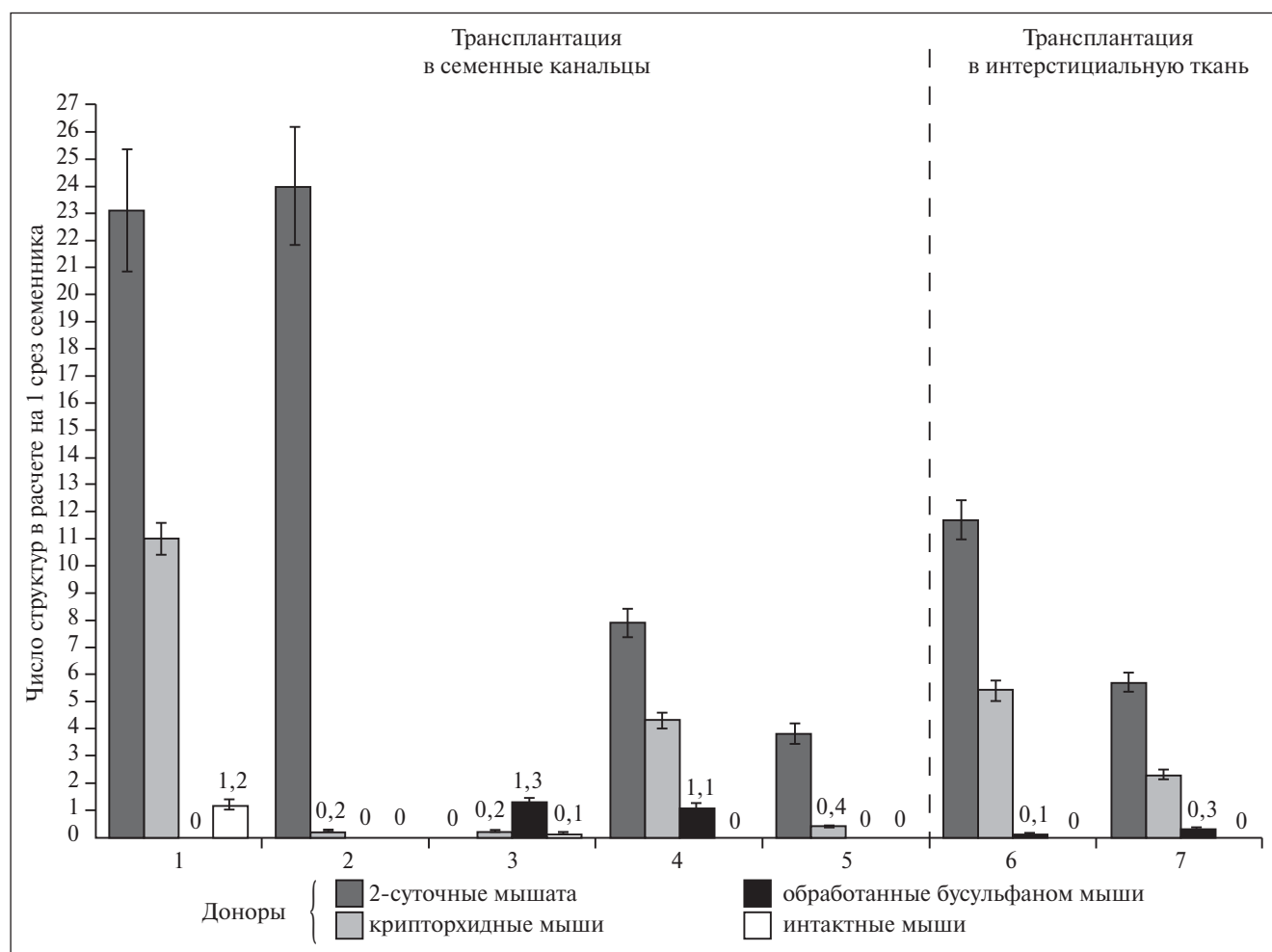


Рис. 3. Число структур, образуемых трансплантированными КС в семенниках реципиентов (в расчете на 1 срез семенника; $M \pm t$); 1 – НК без половых клеток в семенных канальцах реципиента; 2 – НК с половыми клетками в семенных канальцах реципиента; 3 – скопления КС в семенных канальцах реципиента; 4 – КС без половых клеток на базальной мембране в семенных канальцах реципиента; 5 – КС с половыми клетками на базальной мембране в семенных канальцах реципиента; 6 – скопления КС в интерстициальной ткани реципиента; 7 – НК без половых клеток в интерстициальной ткани реципиента

При внутриканальцевом введении суспензии клеток, полученных от крипторхидных мышей, через 1,5 мес трансплантированные клетки обнаруживали в существенно меньшем, чем в положительном контроле, числе канальцев реципиента (рис. 5а); отсутствовали также канальцы большего, чем в норме, диаметра. На рис. 5б представлены НК, образованные клетками донора, в семенном канальце реципиента. НК имеют типичную структуру с расположенными на базальной мембране КС внутри канальца и перитубулярными мышечными клетками по периферии. В других участках семенника КС донора располагались

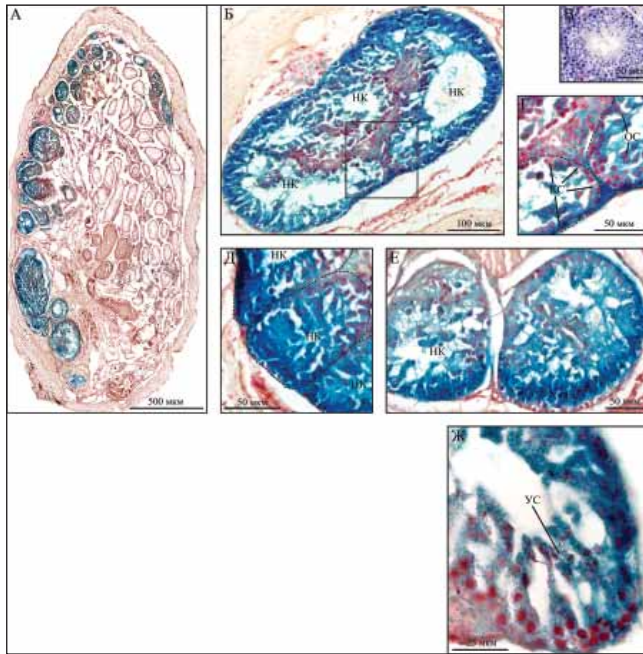


Рис. 4. Гистологические срезы семенников мышей-реципиентов через 1,5 мес после внутриканальцевой трансплантации суспензии клеток семенников 2-суточных мышат; а — поперечный срез семенника, общий вид; б — остов семенного канальца реципиента, увеличенного в размерах за счет формирования в нем сразу нескольких НК с развивающимися половыми клетками донора; в — семенной каналец 2–3-месячного интактного самца линии С57В1/6 (для сравнения приведен в том же масштабе, что и на рис. б); г — увеличенная область семенного канальца, представленного на рис. б (рамка); пунктиром указаны границы 2 прилегающих друг к другу НК, видны ядра КС и развивающиеся до стадии округлых сперматид (ОС) половые клетки; д — несколько прилегающих друг к другу НК с развивающимися половыми клетками, пунктир — границы НК; е — развитие половых клеток в НК (слева) и на базальной мембране канальца реципиента (справа); ж — участок сперматогенного эпителия, образованного трансплантированными КС и развивающимися половыми клетками; видны головки удлиняющихся сперматид (УС). Клетки доноров окрашены X-Gal (синий), ядра клеток докрашены нейтральным красным

на базальной мембране остовов семенных канальцев реципиента (рис. 5в). Там (рис. 5з), а также в НК (рис. 5д) происходило развитие половых клеток донора. В первом случае дифференцировка половых клеток иногда достигала стадии округлых сперматид, во втором — сперматоцитов I порядка на стадии пахитены.

При введении суспензии клеток семенников 2-суточных мышат в интерстициальную ткань семенника реципиента трансплантированные клетки и образованные ими структуры располагались компактно в определенной его области, а не распространялись по всему интерстицию. Важным отличием от внутриканальцевого введения было наличие ярко выраженного воспалительного процесса, свидетельствующего о контакте трансплантированных клеток с клетками иммунной системы реципиента (рис. 6а). Несмотря на воспалительный процесс, КС донора формировали множество НК неправильной формы, но такие канальцы состояли только из КС и не содержали каких-либо половых клеток. В просвете канальцев и на базальной мембране часто располагались лейкоциты, что свидетельствует об отсутствии полностью сформированного гематотестикулярного барьера, необходимого для развития мейотических и постмейотических половых клеток (рис 6в, г).

При введении в интерстиций суспензий клеток, полученных из семенников крипторхидных мышей, через 1,5 мес мы также наблюдали компактное рас-

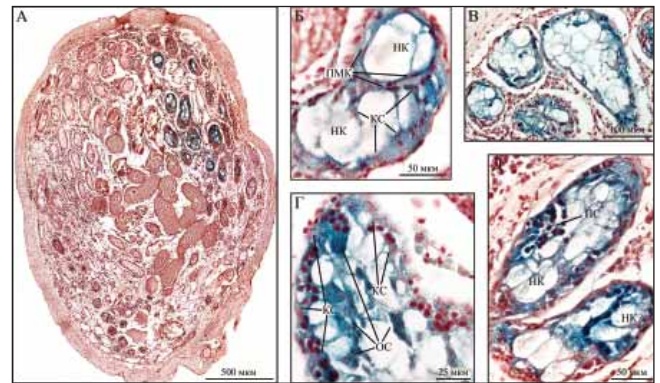


Рис. 5. Гистологические срезы семенников мышей-реципиентов через 1,5 мес после внутриканальцевой трансплантации суспензии клеток семенников крипторхидных мышей: а — поперечный срез семенника, общий вид; б — НК в семенном канальце реципиента, хорошо видны КС и перитубулярные мышечные клетки (ПМК), образующие стенку канальцев; в — КС донора на базальной мембране канальцев реципиента; г — развитие половых клеток донора до стадии округлых сперматид (ОС) на участке базальной мембраны реципиента; видны КС донора, поддерживающие сперматогенез; д — развитие половых клеток в НК; видна группа сперматоцитов I порядка на стадии пахитены (ПС). Клетки доноров окрашены X-Gal (синий), ядра клеток докрашены нейтральным красным

положение трансплантированных клеток донора и формируемых ими структур в семенниках реципиента (рис. 6б). Воспалительный процесс протекал в значительно менее выраженной форме (рис. 6д). Основным типом формируемых клетками донора структур были НК, которые в центре трансплантата практически полностью замещали собой каналцы реципиента (рис. 6б, д), а по периферии располагались в промежутках между остовами каналцев реципиента (рис. 6е). Как и в случае положительного контроля, при введении клеток донора в интерстициальную ткань мы не наблюдали развития половых клеток, и лишь в нескольких каналцах в одном семеннике были обнаружены сперматогонимальные клетки (рис. 6ж).

При внутриканальцевой трансплантации суспензий клеток семенников, полученных от интактных мышей, клетки донора были обнаружены только в одном из 3 инъецированных семенников в единичных семенных каналцах реципиента (рис. 7а). Клетки донора через 1,5 мес после трансплантации были представлены только КС, образующими скопления или формирующими небольшие НК, лишённые половых клеток (рис. 7в). В случае инъекции в интерстициальную ткань клеток донора не было обнаружено ни в одном из семенников реципиентов, которые были заполнены только остовами старых семенных каналцев (рис. 7б, г).

При внутриканальцевой трансплантации суспензий клеток семенников мышей, подвергшихся воздействию бусульфана, через 1,5 мес клетки донора были обнаружены только в одном из 3 инъецированных семенников реципиентов в небольшом числе каналцев (рис. 7д). В отличие от интактного контроля трансплантированные КС чаще встречались на базальной мембране семенных каналцев реципиента и реже формировали НК (рис. 7е, ж). При введении суспензии клеток донора в интерстициальную ткань также в одном из семенников были обнаружены небольшое скопление КС и единичные НК (рис. 7з, и). Ввиду того, что бусульфан избирательно поражает ССК, развития половых клеток в трансплантированных семенниках этой экспериментальной группы не происходило.

Иммуноцитохимический анализ экспрессии цитоцератина-18 в семенных каналцах крипторхидных и подвергшихся воздействию бусульфана мышей. При проведении иммунофлюоресцентной окраски антителами против маркера недифференцированных КС — цитоцератина-18 обнаружена его экспрессия в некоторых КС крипторхидных мышей на 14-е и 45-е сутки после операции (рис. 8). Экспрессирующие цитоцератин-18 клетки располагались как поодиночке, так и группами по 2–10 клеток. Мы не обнаружили увеличения числа цитоцератин-18⁺-КС с 14-х по 45-е сутки крипторхизма. Иммунофлюоресцентный анализ семенных каналцев мышей через 1 мес после введения бусульфана не выявил экспрессии цитоцератина-18КС.

Как видно из результатов количественного и качественного анализа трансплантаций, КС крипторхид-

ных мышей по регенерационным потенциям во много раз превышают интактные КС половозрелых животных и приближаются по этому показателю к неонатальным клеткам. При внутриканальцевом введении они активно формируют НК в просветах старых каналцев, а также прикрепляются к базальной мембране. При интерстициальной инъекции — создают обособленную зону НК между остовами каналцев реципиента, т.е. в результате теплового воздействия, вызванного экспериментальным крипторхизмом, КС вновь приобретают морфогенетические свойства, характерные для них в норме только на дедифференцированной стадии.

Между тем, как показывают результаты количественного анализа, через 1,5 мес после трансплантации лишь в очень немногих НК и участках базальной мембраны каналцев реципиента, где располагаются КС крипторхидных мышей, идет сперматогенный процесс. По этому показателю клетки семенников крипторхидных мышей значительно уступают клеткам, полученным от неонатальных животных. Наиболее вероятная причина этого — различия в свойствах самих ССК, взятых в этих 2 вариантах трансплантаций. ССК неонатальных мышей не так чувствительны к ишемии и отсутствию сигналов и факторов от КС, которые неизбежны в первые часы или даже сутки после трансплантации [3], что косвенно подтверждают наши данные. При внутриканальцевой трансплантации суспензии клеток крипторхидных мышей развитие половых клеток за счет КС донора чаще происходило на базальной мембране семенных каналцев реципиента, чем в НК. Это связано отчасти с тем, что процесс формирования НК, включающий образование новой базальной мембраны, коллагенового слоя и слоя перитубулярных мышечных клеток по периферии каналца, происходит гораздо медленнее, чем процесс прикрепления КС донора к базальной мембране каналцев реципиента, а также формирования ими ниш для ССК. Также известно, что ССК в интактном семеннике располагаются на определенных участках базальной мембраны семенного каналца, где тот граничит с интерстициальной тканью семенника и где проходят крупные кровеносные сосуды [6, 17]. Возможно, что факторы, приходящие из интерстиция и необходимые для регуляции процессов пролиферации и дифференцировки ССК, не могут в необходимом количестве достигнуть ССК, расположенных на базальной мембране НК. Таким образом, отсутствие в большей части новообразованных структур половых клеток связано не с неспособностью «крипторхидных» КС поддерживать их развитие, а с пониженной жизнеспособностью самих половых клеток.

Первые эксперименты по трансплантации КС от крипторхидных мышей, выполненные нами ранее [1], продемонстрировали их высокие регенерационные способности. Однако оставалось неясным, является ли повышение регенерационного потенциала специфичным для теплового воздействия. Можно

было предположить, что любое нарушение сперматогенеза, приводящее к исчезновению дифференцированных половых клеток, повышает регенеративные потенции КС, тем более, что значительное изменение их транскриптома в этом случае – доказанный факт [4, 12]. Также возможно, что при трансплан-

тациях решающую роль играет концентрация КС (а не их число в суспензиях, которое мы выравнивали): концентрация КС в суспензиях клеток семенников от половозрелых интактных мышей составляет, по нашим данным, 8,4%; в суспензиях клеток от 2-суточных мышат и крипторхидных мышей, которые не

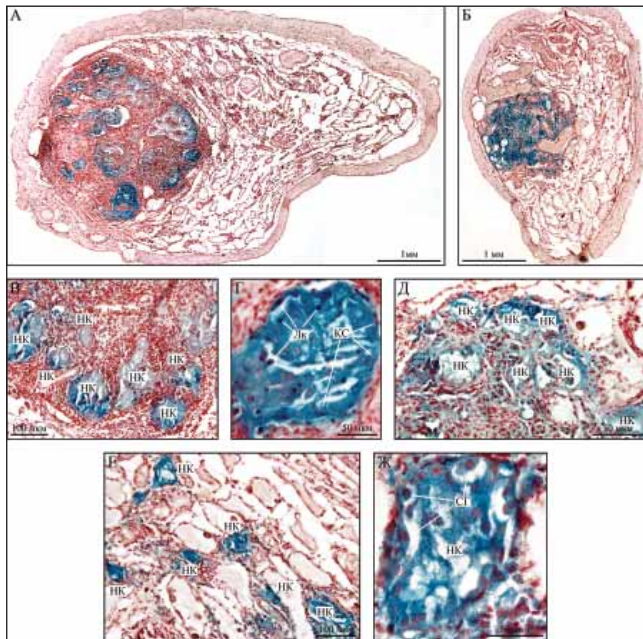


Рис. 6. Гистологические срезы семенников мышей-реципиентов через 1,5 мес после трансплантации суспензий клеток семенников в интерстициальную ткань. а, в, г – доноры – 2-суточные мышата; б, д, е, ж – доноры – крипторхидные мыши; а, б – поперечные срезы семенников, общий вид; в – НК, образованные трансплантированными КС, интерстициальная ткань между канальцами сильно расширена из-за интенсивного воспалительного процесса; г – НК, видны ядра КС и ярко окрашенные ядра лейкоцитов (Лк), проникших в каналец, развивающиеся половые клетки отсутствуют; д – группа НК, образованных КС крипторхидных мышей в центре трансплантата, интерстициальная ткань расширена незначительно; е – группа НК в интерстиции между разрушенными канальцами реципиента на краю трансплантата; ж – НК с ядрами сперматогониев (СГ) донора. Клетки доноров окрашены X-Gal (синий), ядра клеток докрашены нейтральным красным

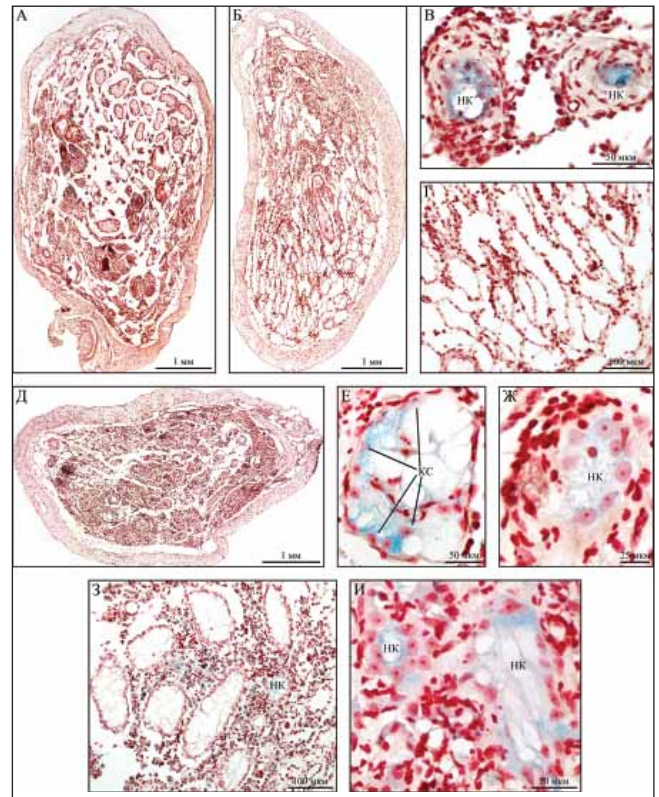


Рис. 7. Гистологические срезы семенников мышей-реципиентов через 1,5 мес после введения суспензий клеток семенников, полученных от интактных самцов (а–г), и мышей, подвергшихся воздействию бусульфана (д–и). а, в, д, е, ж – введение в канальцы; б, г, з, и – в интерстиций; а, б, д – поперечные срезы семенников реципиентов, общий вид; в, ж – НК в канальцах реципиента; г – трансплантированные клетки не обнаружены, видны лишь остовы канальцев реципиента; е – КС донора на базальной мембране канальца реципиента; з, и – НК, образованные в интерстициальной ткани. Клетки доноров окрашены X-Gal (синий), ядра клеток докрашены нейтральным красным

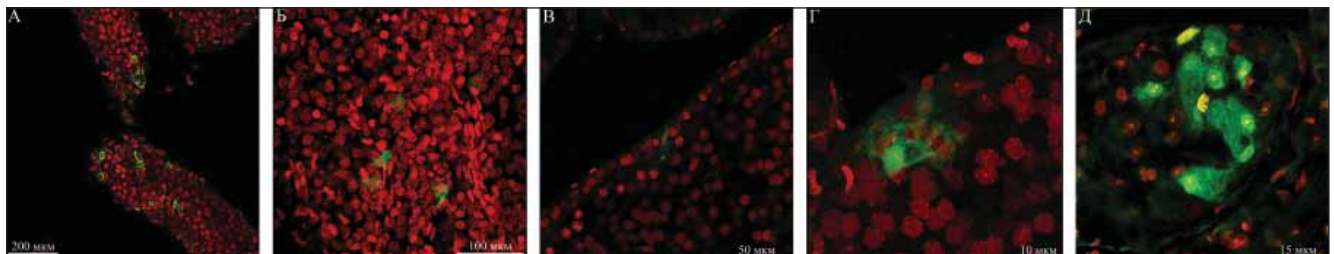


Рис. 8. Экспрессия цитокератина-18 КС крипторхидных мышей на 14-е (а, б) и 45-е (в–д) сутки крипторхизма. Зеленый – окраска на цитокератин-18, ядра подкрашены пропидия йодидом (красный)

содержат дифференцированных половых клеток, она равна соответственно 59,2% и 40,0%. Однако проведенные в данной работе эксперименты с трансплантацией клеток из семенников мышей, подвергшихся воздействию бусульфана, полностью опровергают эти предположения. Через 1 мес после введения высокой дозы бусульфана в семенниках исчезают все дифференцированные половые клетки, транскриптом КС значительно изменяется, концентрация КС в суспензии возрастает до 65%. Между тем, по данным как количественного, так и качественного анализа трансплантаций, суспензии клеток семенников от мышей, подвергшихся воздействию бусульфана, мало отличаются по регенерационным свойствам от суспензий клеток семенников интактных половозрелых животных. Таким образом, высокий регенерационный потенциал КС приобретают именно при тепловом воздействии, что, скорее всего, связано с их дедифференцировкой. Опыты по обнаружению цитокератина-18 подтверждают это предположение.

Белок промежуточных филаментов цитокератин-18 – один из широко используемых маркеров недифференцированных КС. Он экспрессируется неонатальными КС модельных животных [2, 18]. Экспрессия цитокератина-18 появляется у КС после теплового воздействия, вызванного тепловым шоком и экспериментальным крипторхизмом, и считается одним из признаков их дедифференцировки [18, 20]. Однако данных об экспрессии этого белка у КС мышей в литературе нет. Нами показана его экспрессия у мышей после 14 и 45 сут экспериментального крипторхизма. У крыс, макак-резусов после теплового шока или крипторхизма экспрессия цитокератина-18

наблюдается практически во всех КС [18, 20], в то время как у мышей, по данным настоящего исследования, как на 14-е, так и на 45-е сутки крипторхизма этот белок выявляется лишь в отдельных КС или в группах (см. рис. 8). Возможно, экспрессия цитокератина-18 только отдельными КС в данном случае связана с особенностями их дифференцировки у мышей: уровень мРНК цитокератина-18 высок в КС в период эмбрионального развития, но резко снижается уже у неонатальных мышат [2]. Однако наличие этого белка в КС крипторхидных мышей – несомненный признак их дедифференцировки. Характерно, что в семенниках мышей, подвергшихся воздействию бусульфана, экспрессии цитокератина-18 мы не обнаружили. Этим фактом еще раз подтверждается специфичность воздействия повышенной температуры на КС, а также связь между их дедифференцировкой и регенерационными потенциалами.

ВЫВОДЫ

На модели экспериментального крипторхизма мышей установлено, что КС способны значительно повышать свой регенерационный потенциал и, подобно клеткам неонатальных животных, формировать НК и поддерживать развитие половых клеток. Впервые в КС крипторхидных мышей обнаружена экспрессия маркера недифференцированных КС – цитокератина-18, что вместе с данными о повышении их регенерационного потенциала свидетельствует о дедифференцировке. Показано, что понижение уровня цитодифференцировки индуцирует тепловое воздействие, а не изменение концентрации КС и(или) исчезновение половых клеток из семенников.

ЛИТЕРАТУРА

1. Малолина Е.А., Кулибин А.Ю., Маршак Т.А. и др. Регенерационный потенциал трансплантированных клеток Сертולי взрослых мышей // *Бюл. экск. биол. и мед.* – 2011; 151 (5): 585–8.
2. Appert A., Fridmacher V., Locquet O. et al. Patterns of keratins 8, 18 and 19 during gonadal differentiation in the mouse: sex- and time-dependent expression of keratin 19 // *Differentiation*. – 1998; 63: 273–84.
3. Arregui L., Rathi R., Zeng W. et al. Xenografting of adult mammalian testis tissue // *Anim. Reprod. Sci.* – 2008; 106 (1–2): 65–76.
4. Boujrad N., Hochereau-de Reviers N., Carreau S. Evidence for germ cell control of Sertoli cell function in three models of germ cell depletion in adult rat // *Biol. Reprod.* – 1995; 53: 1345–52.
5. Chen M., Cai H., Yang J.-L. et al. Effect of heat stress on expression of junction-associated molecules and upstream factors androgen receptor and wilms' tumor 1 in monkey Sertoli cells // *Endocrinology*. – 2008; 149 (10): 4871–82.
6. Chiarini-Garcia H., Hornick J., Griswold M. et al. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random // *Biol. Reprod.* – 2001; 65: 1179–85.
7. Dufour J., Rajotte R., Korbitt G. Development of an in vivo model to study testicular morphogenesis // *J. Androl.* – 2002; 23 (5): 635–44.
8. Liu Y.-X., Li X.-X. Molecular basis of cryptorchidism-induced infertility // *Sci. China Life Sci.* – 2010; 53 (11): 1274–83.
9. Mendis-Handagama S., Kerr J., de Kretser D. Experimental cryptorchidism in the adult mouse: I. Qualitative and quantitative light microscopic morphology // *J. Androl.* – 1990; 11 (6): 539–47.
10. Ogawa T., Arechaga J., Avarbock M. et al. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules // *Int. J. Dev. Biol.* – 1997; 41: 111–22.
11. Rao M., Pham J., Imam J. et al. Tissue-specific RNAi reveals that Wt1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis // *Genes. Dev.* – 2006; 20 (2): 147–52.
12. O'Shaughnessy P., Hu L., Baker P. Effect of germ cell depletion on levels of specific mRNA transcripts in mouse Sertoli cells and Leydig cells // *Reproduction*. – 2008; 135 (6): 839–50.
13. Shinohara T., Avarbock M., Brinster R. Functional analysis of spermatogonial stem cells in steel and cryptorchid infertile mouse models // *Dev. Biol.* – 2000; 220: 401–11.
14. Shinohara T., Orwig K., Avarbock M. et al. Restoration of spe matogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation // *Biol. Reprod.* – 2003; 68: 1064–71.
15. Skinner M., Griswold M. Sertoli cell biology. – London, Elsevier Academic Press. – 2005.
16. Udagawa K., Takeda M., Hosaka M. et al. Recovery of spermatogenesis by high dose gonadotropin-releasing hormone analogue treatment in rat cryptorchid testis after orchidopexy // *J. Urol.* – 2002; 168: 1279–83.
17. Yoshida S., Sukeho M., Nabeshima Y. A Vasculature-associated niche for undifferentiated spermatogonia in the mouse testis // *Science*. – 2007; 317 (5845): 1722–6.
18. Zhang Z.-H., Hu Z.-Y., Song X.-X. et al. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism // *Int. J. Androl.* – 2004; 27: 234–9.
19. Zhang X.-S., Zhang Z.-H., Guo S.-H. et al. Activation of extracellular signal-related kinases 1 and 2 in Sertoli cells in experimentally cryptorchid rhesus monkeys // *Asian J. Androl.* – 2006; 8 (3): 265–72.
20. Zhang X.-S., Zhang Z.-H., Jin X. et al. Dedifferentiation of adult non-key Sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase – induced by heat treatment // *Endocrinology*. – 2006; 147 (3): 1237–45.