

ХАРАКТЕРИСТИКА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК СЕРТОЛИ В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОЙ ТЕМПЕРАТУРЫ И ГИПОКСИИ

© А. Ю. Кулибин,¹ Е. А. Малолина²

¹ Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН

и ² Научно-исследовательский институт вирусологии им. Д. И. Ивановского Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, Москва;

¹ электронный адрес: Kulibin.A.BKRJ@gmail.com

Клетки Сертоли (КС), полученные от половозрелых мышей линии C57Bl/6, были охарактеризованы при четырех различных условиях первичной культуры: 1) стандартных — 34 °C, 21 % O₂ (культура 34_21); 2) при повышенной температуре — 37 °C, 21 % O₂ (условие 37_21); 3) при гипоксии — 34 °C, 5 % O₂ (культура 34_5); 4) при сочетании обоих факторов — 37 °C, 5 % O₂ (культура 37_5). Гипоксия способствует повышению пролиферативной активности КС и их жизнеспособности (в культурах 34_5 и 37_5 на 15-е сут культивирования соответственно 28.5 и 24.6 % клеток, меченных BrdU, находятся на пике пролиферативной активности, 92.7 и 92.7 % клеток жизнеспособны против 20.2 % BrdU⁺-клеток и 88.9 % живых клеток в культуре 34_21). Культивирование при повышенной температуре незначительно увеличивает пролиферацию, но снижает жизнеспособность клеток (23.1 % BrdU⁺-клеток, 74.9 % живых клеток в культуре 37_21). В то же время культивирование при 37 °C в условиях как гипоксии, так и нормоксии способствует дедифференцировке КС: через 15 сут 98.8 (37_5) и 98.6 (37_21) % клеток экспрессируют маркер недифференцированных КС цитокератин-18, а в культурах 34_5 и 34_21 только 26.5 и 6.6 % клеток соответственно. Экспрессия транскрипционного фактора КС Wt1, необходимого для формирования межклеточных контактов и поддержания развития половых клеток, исчезает на 3-и сут в большинстве клеток при всех условиях культивирования, но восстанавливается через 15 сут в КС, формирующих колонии только при 37 °C (59.1, 29.5, 11.1 и 3.6 % Wt1⁺-клеток в культурах 37_21, 37_5, 34_21 и 34_5 соответственно). Экспрессия других маркеров КС — виментина, кластерина и Gata-4 — неизменна при всех условиях ведения культуры. На основании полученных результатов мы предполагаем, что культивируемые КС могут оказаться полезными как для репродуктивной биологии, так и для регенеративной медицины.

Ключевые слова: клетки Сертоли, гипоксия, тепловое воздействие, цитокератин-18, Wt1.

Принятые сокращения: КС — клетки Сертоли, ПМК — перитубулярные мышечные клетки, ПФА — параформальдегид.

Клетки Сертоли (КС) — соматические клетки, играющие центральную роль в развитии и функционировании семенников. До окончания пубертатного периода они представляют собой активно пролиферирующую недифференцированную популяцию клеток, обладающих высокими морфогенетическими потенциями. Однако у половозрелых особей млекопитающих, за исключением сезонно размножающихся видов, КС прекращают деления и дифференцируются: между ними формируются плотные контакты, образующие гематотестикулярный барьер; они приобретают способность поддерживать развитие мужских половых клеток, но теряют морфогенетический потенциал; значительно изменяется спектр синтезируемых ими белков.

Долгое время КС считались одним из примеров терминально дифференцированных клеток наряду с нейронами, клетками эпидермиса и миоцитами. Однако в работе Ахмеда с сотрудниками (Ahmed et al., 2009) было установлено, что в культуре КС половозрелых животных и человека вновь приобретают способность к пролифера-

ции. Этими же авторами было показано, что КС половозрелых животных после радиационного воздействия репарируют двухцепочечные разрывы ДНК, что нехарактерно для терминально дифференцированных клеток. Таким образом, заключают авторы этого исследования, КС дифференцированы, но не терминально, пролиферация КС блокирована факторами их микроокружения, но возможна при исчезновении этих факторов. После этого первого сообщения вышло еще несколько работ, в которых была подтверждена пролиферация КС половозрелых животных и человека в культуре (Chui et al., 2011; Sato et al., 2013) и *in vivo* после супрессии гонадотропинов (Pitetti et al., 2012).

Благодаря этим исследованиям открылась новая сторона биологии КС, которая требует дальнейшего изучения. Неясен дифференцировочный статус пролиферирующих КС половозрелых животных. Неизвестно, сохраняют ли эти клетки свои функциональные свойства и приобретают ли морфогенетические. Необходимо также отметить, что используемая в настоящее время мето-

дика культивирования КС несовершенна. Поэтому КС неонатальных животных, активно пролиферирующие в культуре, быстро перестают экспрессировать многие важные белки, определяющие свойства КС и их способность поддерживать сперматогенез, например транскрипционные факторы Wt1, Sox9, Gata-4 и др. (Skinner, Griswold, 2005; Buganim et al., 2012).

Цель нашего исследования заключалась в получении характеристики КС половозрелых мышей, определении их дифференцировочного и функционального статуса при культивировании в стандартных условиях и в модифицированных — при повышенной температуре и пониженном содержании кислорода.

Материал и методика

Донорами клеток для культуры служили самцы мышей линии C57Bl/6 2—3-месячного возраста. Мышей содержали в стандартных условиях вивария с режимом 12-часового дня и 12-часовой ночи, воду и корм животные получали *ad libitum*.

Получение суспензии клеток для культуры. Мышей-доноров забивали дислокацией шейных позвонков, выделяли их семенники и на 5 мин помещали в раствор Хенкса с пенициллином и стрептомицином (50 Ед/мл, ПанЭко, Россия). Затем семенники инкубировали в растворе коллагеназы IV (0.7 мг/мл) и ДНКазы I (0.04 %) (Sigma, США) 15 мин при 34 °С. По окончании инкубации большая часть клеток интерстициальной ткани семенника оказывалась в растворе. Семенные каналцы, содержащие КС, перитубулярные мышечные клетки (ПМК) и половые клетки 3 раза отмывали от клеток интерстиция раствором Хенкса. Для получения суспензии клеток каналцы помещали в раствор трипсина (0.25 %) с 1 мМ ЭДТА (Sigma, США) на 15 мин при 37 °С, затем отмывали 3 раза раствором Хенкса и разбивали на отдельные клетки пипетированием. Полученную клеточную суспензию пропускали через фильтры с размерами 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, Россия), подсчитывали число клеток и их жизнеспособность.

Культуры КС. Суспензии клеток высевали на чашки Петри (SPL Lifesciences, Корея) из расчета $2 \cdot 10^5$ кл./см² в среде α MEM/F12, содержащей 5 % эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, ThermoScientific, США), L-глутамин, пируват натрия и смесь пенициллина со стрептомицином (ПанЭко, Россия). Через 1 сут культуры 2 раза отмывали от неприкрепившихся клеток раствором Хенкса и меняли среду на среду того же состава, но содержащую 1 % сыворотки.

Первичные культуры КС характеризовали при четырех различных условиях: 1) при стандартных условиях культивирования (Ahmed et al., 2009), т. е. при 34 °С (34 °С — температура при которой КС функционируют в условиях *in vivo*) и газовой смеси, содержащей 5 % CO₂ и 21 % O₂ (культура 34_21); 2) при повышенной температуре — 37 °С, 5 % CO₂ и 21 % O₂ (культура 37_21); 3) при пониженном содержании кислорода — 34 °С, 5 % CO₂ и 5 % O₂ (культура 34_5) и 4) при сочетании обоих факторов — 37 °С, 5 % CO₂ и 5 % O₂ (37_5). Такие варианты культивирования были выбраны по следующим причинам. Повышение температуры способствует дедифференцировке КС *in vivo* и *in vitro* (Zhang et al., 2004, 2006;

Chen et al., 2008; Малолина и др., 2011; Малолина, Кулибин, 2012). Пониженное содержание кислорода (5 %) по сравнению со стандартным (21 %) при культивировании по сути является физиологической нормой для клеток *in vivo* и в условиях культуры способствует повышению жизнеспособности и пролиферации клеток (Буравкова и др., 2009; Forristal et al., 2010; Basciano et al., 2011).

Подсчет числа и жизнеспособности клеток в культурах. Клетки в культурах считали на 3, 6, 9, 12 и 15-е сут культивирования с помощью камеры Горяева. Среднее число клеток в каждой культуре на каждом сроке фиксации получали от трех независимых измерений. Число мертвых клеток определяли по окрашиванию суспензии клеток трипановым синим.

Подсчет числа и размеров колоний. На 6, 9, 12 и 15-е сут культивирования подсчитывали число и определяли размер колоний в культурах КС. Для этого при фазовом контрасте производили съемку культуры (по 2 чашки Петри на каждый срок фиксации, по 20 случайно выбранных полей зрения) при увеличении объектива 5× на микроскопе Olympus IX51 (Япония). Фотографии затем анализировали в программе Photoshop (Adobe Inc., США), подсчитывали число колоний и определяли их площадь.

Иммунофлуоресцентный анализ. Для определения концентрации КС в культурах и их дифференцировочного и функционального статуса иммунофлуоресцентным методом изучали экспрессию клетками маркеров виментина, кластерина, цитокератина-18, GATA-4 (транскрипционного фактора, распознающего последовательности ДНК, известные как GATA-мотив) и Wt1 (Wilms' tumor protein 1). Концентрацию ПМК в культурах определяли по экспрессии клетками культуры α -актина. Пролиферативную активность КС и ПМК исследовали по включению клетками метки BrdU, которую добавляли в культуру за 15 ч до окраски. Иммунофлуоресцентное исследование культур проводили на 3, 9 и 15-е сут культивирования. Стекла с клетками дважды отмывали от среды PBS (ПанЭко, Россия) и фиксировали 4%-ным параформальдегидом (ПФА, Sigma, США) 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки отмывали от фиксатора и помещали в блокирующий раствор (3%-ный бычий сывороточный альбумин, содержащий 0.05 % Тритона X-100 (Panreac, США) на PBS) на 30 мин при 37 °С. Не отмывая от блокирующего раствора, стекла с клетками опускали в каплю PBS-Tween 20 (0.05 %, AppliChem GmbH, Германия) с первичными кроличьими антителами (против: виментина (Millipore, США), цитокератина-18, Wt1 (LifeSpan Biosciences, США), GATA-4 (Abcam, Великобритания), кластерина, α -актина (SantaCruz Biotechnology, США)) и инкубировали с ними 1 ч при 37 °С. В качестве вторых антител использовали козы антикроличьи IgG Alexa Fluor 594 conjugated (Jackson Immuno Research Labs, США), с которыми стекла инкубировали 30 мин при 37 °С в темноте. Затем перед окраской на BrdU стекла с клетками снова фиксировали 4%-ным ПФА 5 мин, отмывали и инкубировали в смеси 4 N HCl и 70%-ного этанола (1 : 1) 30 мин при комнатной температуре, а затем в растворе с AffiniPure Fab Fragment goat anti-mouse IgG (H+L) (Jackson ImmunoResearch Labs, США) 30 мин при 37 °С. В качестве первых антител использовали мышиные anti-BrdU (BD, США), а в качестве вторых — кроличьи антимышиные IgG Fite conjugated (Daco, США). Ядра докрашивали ядерным флуоресцентным красителем DAPI (Sigma, США). Окрашенные клетки фотографиро-

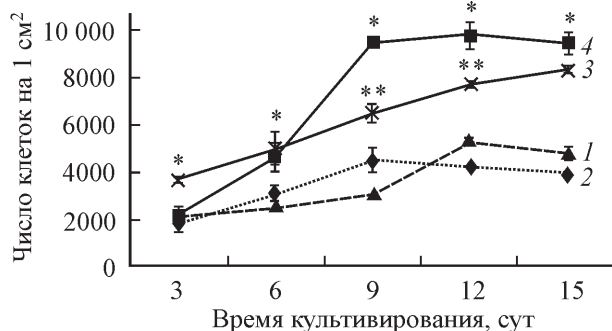


Рис. 1. Динамика изменения числа клеток Сертоли (КС) при четырех условиях культивирования: стандартных — 34 °C и 21 % O₂ (культура 34_21, кривая 1), при повышенной температуре — 37 °C и 21 % O₂ (культура 37_21, кривая 2), при пониженном содержании кислорода — 34 °C и 5 % O₂ (культура 34_5, кривая 3) и при сочетании обоих факторов — повышенной температуре и пониженном содержании кислорода (культура 37_5, кривая 4).

Данные представлены в виде среднего числа клеток на 1 см² поверхности. Вертикальные отрезки здесь и на других рисунках — стандартная ошибка среднего; одной звездочкой показана достоверность различия числа клеток в культурах 37_5 и 34_5 по сравнению с культурами 37_21 и 34_21, двумя звездочками — между культурами 37_5 и 34_5 ($P < 0.05$).

вали и подсчитывали на микроскопе Keyence BZ-9000 (Keyence, США).

Статистический анализ. Количественные данные, полученные в трех независимых экспериментах, анализировали в статистическом пакете STATISTICA 8.0 (StatSoft, США). Сравнение средних значений в контрольных и экспериментальной выборках проводили с использованием параметрических и непараметрических критериев сравнения для независимых выборок (t -тест Стьюдента и W -критерий Вилкоксона).

Результаты

Динамика изменения числа клеток в культурах и их жизнеспособность. Как видно на рис. 1, число клеток на 1 см² в культурах с низким содержанием кислорода в газовой смеси, начиная с 6-х сут наблюдения и вплоть до 15-х сут, было выше, чем в культурах со стандартным высоким содержанием кислорода. Эти данные согласуются с результатами подсчета числа живых клеток (см. таблицу): доля живых клеток (не окрашивающихся трипановым синим) в культурах с низким содержанием кислорода больше, чем с высоким, начиная с 9-х сут культивирования. Наиболее низкая жизне-

способность была в культуре 37_21 на последних сроках культивирования, и эти данные коррелируют со снижением числа клеток (рис. 1). Также видно, что в культуре 37_5 на 9—15 сут культивирования число клеток выше, чем в культуре 34_5. Через 9—15-е сут культивирования активный рост культур прекращался, что объясняется формированием монослоя и контактным ингибированием пролиферации.

Подсчет числа и размеров колоний. Во всех исследуемых вариантах культуры мы наблюдали формирование колоний. Колонии были образованы только КС, так как все клетки окрашивались на маркер КС кластерин (рис. 2). Подсчет числа колоний на 1 см² культуральной поверхности показал, что их число в период 6—12 сут незначительно увеличивалось в культурах 37_21 и 37_5, а затем снижалось к 15 сут (рис. 3). В культуре 34_21 число колоний значимо не изменялось в течение всего срока культивирования. В культуре 34_5 число колоний на всех сроках наблюдения было выше (в 2—3 раза), чем в других культурах; к 15-м сут число колоний снижалось по сравнению с на 12-е сут. Подсчет суммарной площади колоний на 1 см² культуральной поверхности показал, что активный рост колоний происходил в промежутке между 6-ми и 12-ми сут культивирования во всех вариантах культуры (рис. 4). Суммарная площадь колоний в культуре 34_5 на 12-ми и 15-ми сут была выше, чем в остальных культурах. Измерения средней площади колоний показали, что минимальные размеры колоний были в культуре 34_5, а максимальные — в культуре 37_5 на 15-е сут культивирования (рис. 5). Размер колоний в культурах 37_21 и 37_5 постепенно увеличивался в течение всего срока культивирования, в культурах 34_21 и 34_5 увеличение размеров колоний прекращалось соответственно на 12-е и 9-е сут, далее их размер снижался из-за гибели части клеток колоний.

Экспрессия КС виментина и кластерина. В семенных канальцах виментин и кластерин экспрессируют только КС, но не половые клетки; показано, что экспрессия этих белков не исчезает в КС в процессе культивирования (Ahmed et al., 2009); это делает их отличными маркерами КС в культуре. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что доля виментин⁺- и кластерин⁺-клеток (КС), составляющая на 3-и сут культивирования от 60 до 80 % в разных вариантах культуры, к последнему сроку фиксации увеличилась во всех культурах почти до 100 % (рис. 6, а; 7, а—з).

Экспрессия КС цитокератина-18. Цитокератин-18 экспрессируется в семенниках млекопитающих в эмбриональном и раннем постнатальном периодах развития в недифференцированных КС, его экспрессия пропадает в КС половозрелых животных. Таким образом, цито-

Доля живых клеток (%) при четырех различных условиях культивирования

Условия (культура)	Время культивирования, сут				
	3	6	9	12	15
37_21	91.2 ± 5.1	85.5 ± 4.3	79.7 ± 5.5	82.0 ± 3.1	74.9 ± 5.3 ^a
37_5	88.1 ± 8.0	90.1 ± 4.2	94.8 ± 3.2	92.3 ± 6.8	92.7 ± 1.9
34_21	90.4 ± 2.1	90.8 ± 5.1	88.1 ± 4.2	87.0 ± 3.7	88.9 ± 2.2
34_5	94.7 ± 3.2	94.9 ± 2.5	93.2 ± 3.2	92.9 ± 2.0	92.7 ± 5.3

^a Среднее значение доли жизнеспособных клеток статистически достоверно ниже, чем в остальных культурах ($P < 0.05$).

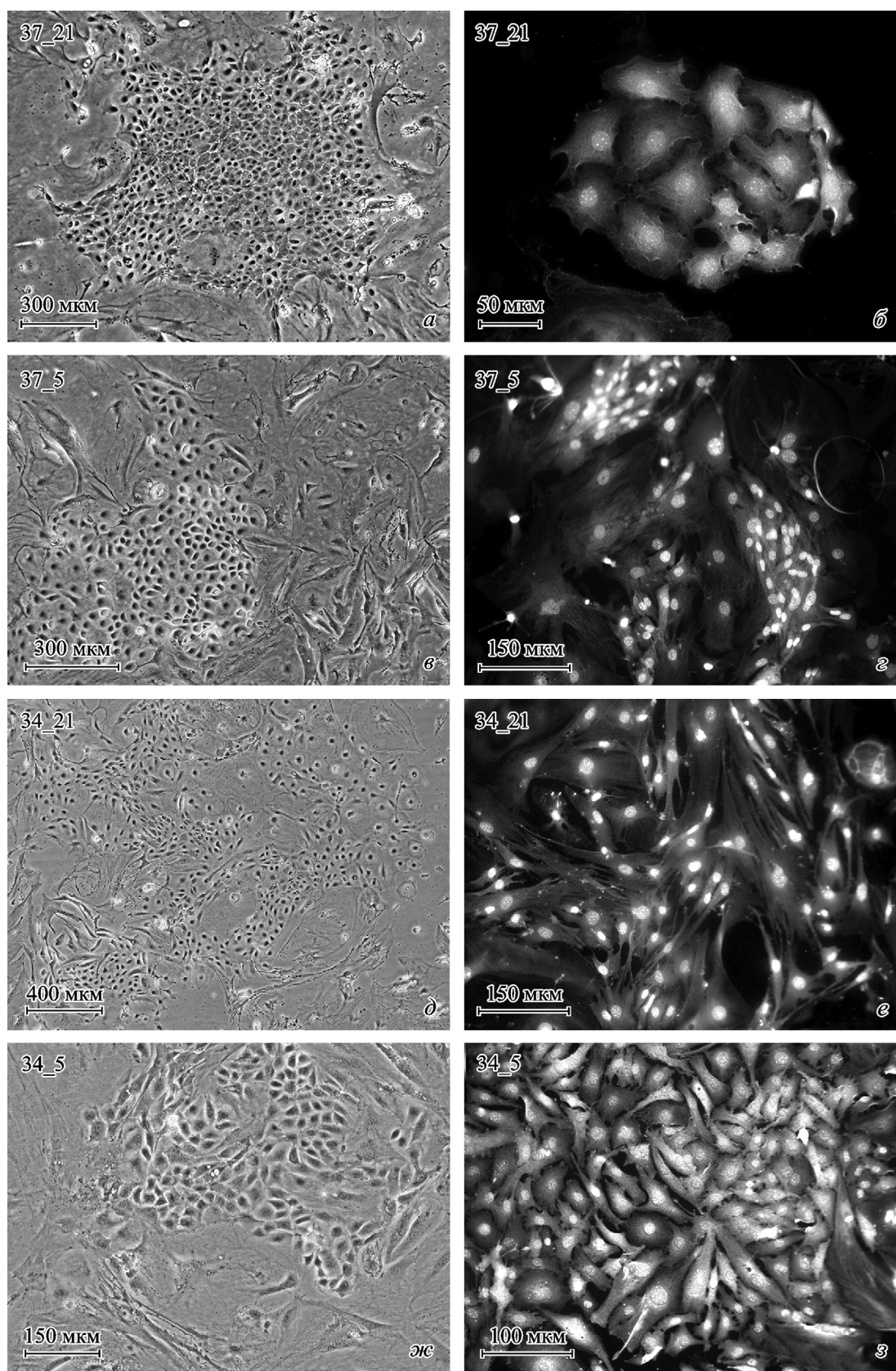


Рис. 2. Вид колоний, образуемых КС, при четырех условиях культивирования.

а, в, д, ж — фазовый контраст; *б, г, е, з* — иммунофлуоресценция, окраска на маркер КС кластерин, ядра окрашены DAPI. *а, б, г, е* — 15-суточные; *в, ж, з* — 12-суточные культуры. Условия культивирования см. в подписи к рис. 1.

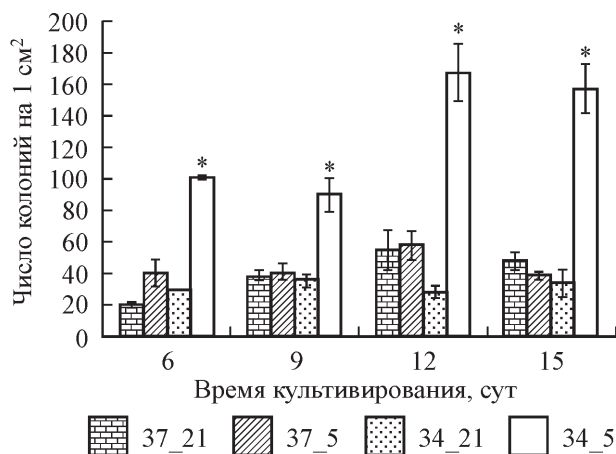


Рис. 3. Динамика изменения числа колоний, образуемых КС, при четырех условиях культивирования.

Данные представлены в виде среднего числа колоний на 1 см² поверхности; звездочкой показана достоверность отличия числа колоний данной культуры от числа в остальных культурах ($P < 0.05$).

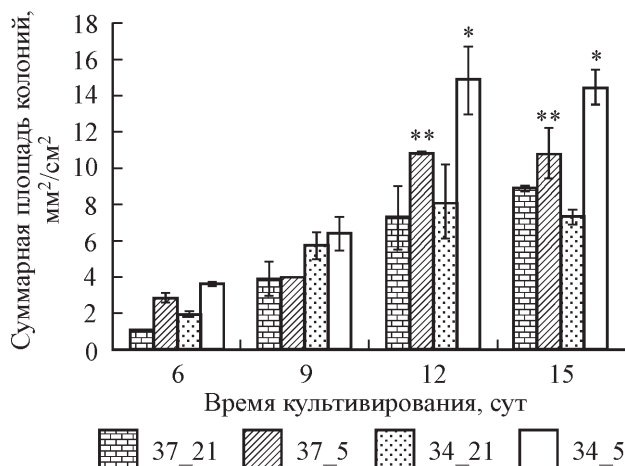


Рис. 4. Динамика изменения общей площади колоний, образуемых КС на 1 см² поверхности, при четырех условиях культивирования.

Одной звездочкой показана достоверность отличия площади колоний данной культуры от площади в остальных культурах, двумя звездочками — различия между культурами 37_5 и (37_21 и 34_21) ($P < 0.05$).

кератин-18 является маркером недифференцированных КС (Appert et al., 1998). Исследование экспрессии культивируемыми КС цитокератина-18 показало, что на 3-и сут культивирования в культурах 37_21 и 37_5 его экспрессировали 70 и 75 % клеток соответственно, а на 15-е сут доля цитокератин-18⁺-клеток увеличивалась до 98 % в обеих культурах (рис. 6, в; 7, и, к). В культуре 34_5 доля цитокератин-18⁺-клеток на 3-и сут не отличалась от доли в культурах 37_21 и 37_5, но в процессе культивирования снижалась и на 15-е сут составляла 26 % (рис. 6, г; 7, м). В культуре 34_21 доля цитокератин-18⁺-клеток уже на 3-и сут была ниже, чем в остальных культурах (30 %), и продолжала снижаться, а на 15-е сут только единичные клетки в этой культуре окрашивались на цитокератин-18 (рис. 6, в; рис. 7, л).

Экспрессия КС маркеров Wt1 и Gata-4. Важным маркером КС является белок Wt1 — транс-

крипционный фактор, определяющий способность этих клеток формировать межклеточные контакты и поддерживать развитие половых клеток (Chen et al., 2008). Экспрессия транскрипционного фактора Gata-4 в семенниках также ограничена КС, этот фактор играет большую роль в процессе развития мужской половой системы (Viger et al., 1998; Tremblay, Viger, 1999), но его роль в сперматогенезе взрослых животных еще не изучена. Экспрессия Wt1 и Gata-4 в семенниках половозрелых мышей наблюдается во всех КС. В культуре часть КС теряет способность экспрессировать Wt1: на 3-и сут культивирования доля Wt1⁺-клеток во всех культурах не превышала 20 %, что значительно ниже, чем доля виментин⁺- и кластерин⁺-клеток на том же сроке культивирования (рис. 6, з). Однако к 15-е сут в культурах 37_21 и 37_5 доля Wt1⁺-КС возросла, в основном за счет клеток, образующих колонии (рис. 7, н, о), и достигла 60 и 30 % соответственно (рис. 6, з). В культурах 34_21 и 34_5, напротив, только единичные клетки в колониях на 15-е сут культивирования экспрессировали Wt1 (рис. 7, н, п), и доля этих клеток в культуре снижалась (рис. 6, з). Экспрессия Gata-4 в культурах КС изучена нами только на 15-е сут культивирования. По данным иммунофлуоресцентного анализа, все клетки во всех вариантах культуры окрашивались на GATA-4 (рис. 7, с—ф).

Пролиферативная активность клеток при четырех условиях культивирования по данным включения BrdU. На 3-и сут наблюдения доля клеток, включающих метку BrdU, была выше в культурах 34_5 и 37_5 (по сравнению с 34_21 и 37_21) и составила 24.6 и 28.5 % соответственно (рис. 8). На 9-е и 15-е сут этот показатель снижался в обеих культурах, причем в культуре 37_5 — более резко. У культур 34_21 и 37_21 максимум наблюдаемого включения BrdU приходился на 9-е сут, и концентрация BrdU⁺-клеток (23.1 и 20.2 % соответственно) была ниже, чем в культурах 34_5 и 37_5 на 3-и сут (рис. 8). К 15-м сут включение BrdU также снижалось.

Исследование экспрессии культивируемыми клетками маркера КС кластерина и включения BrdU (рис. 8, а)

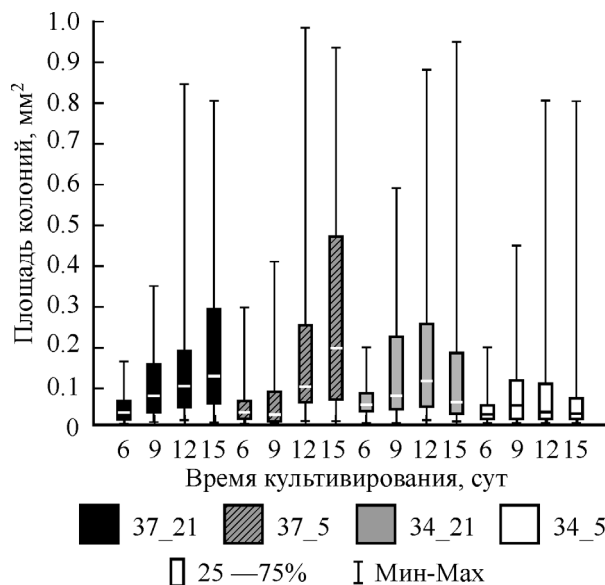


Рис. 5. Динамика изменения средней площади колоний при четырех условиях культивирования.

Линия в прямоугольнике — медиана.

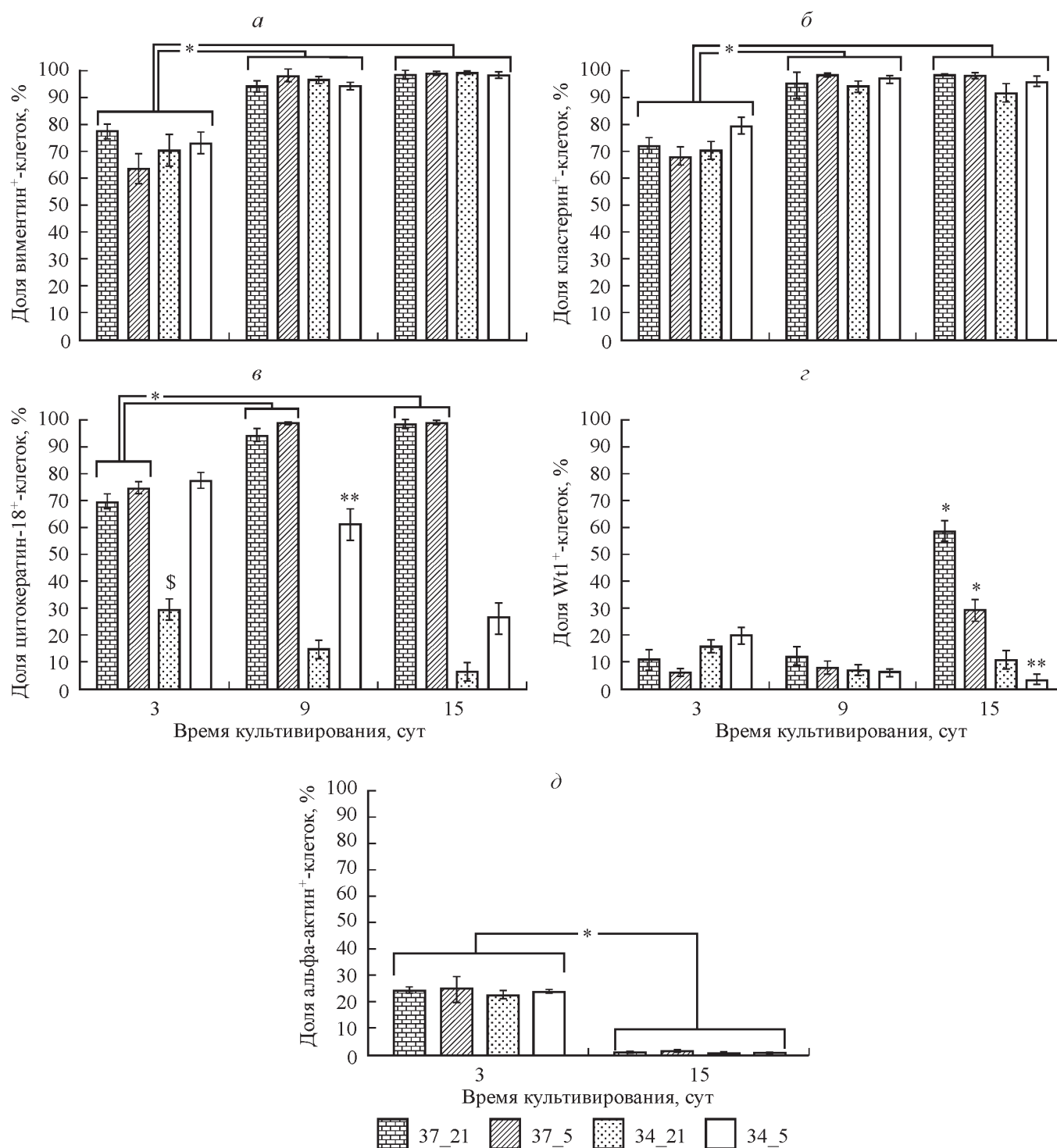


Рис. 6. Динамика изменения количества клеток, экспрессирующие различные маркеры КС и перитубулярных мышечных клеток (виментин, кластерин, цитокератин-18, Wt1 и α -актин), при четырех условиях культивирования.

а, б — доля клеток, окрашивающихся соответственно на виментин и кластерин, больше на 9-е и 15-е сут, чем на 3-и сут культивирования (показано звездочкой); в — доля цитокератин-18⁺-клеток возрастает к 9-м сут только в культурах 37_21 и 37_5 (показано звездочкой), в культуре 34_21 понижается на 3-и сут (показано знаком \$), в культуре 34_5 снижается по сравнению с культурами 37_21 и 37_5 только на 9-и сут (показано двумя звездочками); г — доля КС, экспрессирующих маркер Wt1, увеличивается на 15-и сут в культурах 37_21 и 37_5 (показано одной звездочкой) и снижается в культуре 34_5 на 15-е сут по сравнению с 3-ми сут (показано двумя звездочками); д — доля α -актин⁺-клеток больше на 3-и сут культивирования, чем на 15-е (показано одной звездочкой). Все различия достоверны при $P < 0.05$.

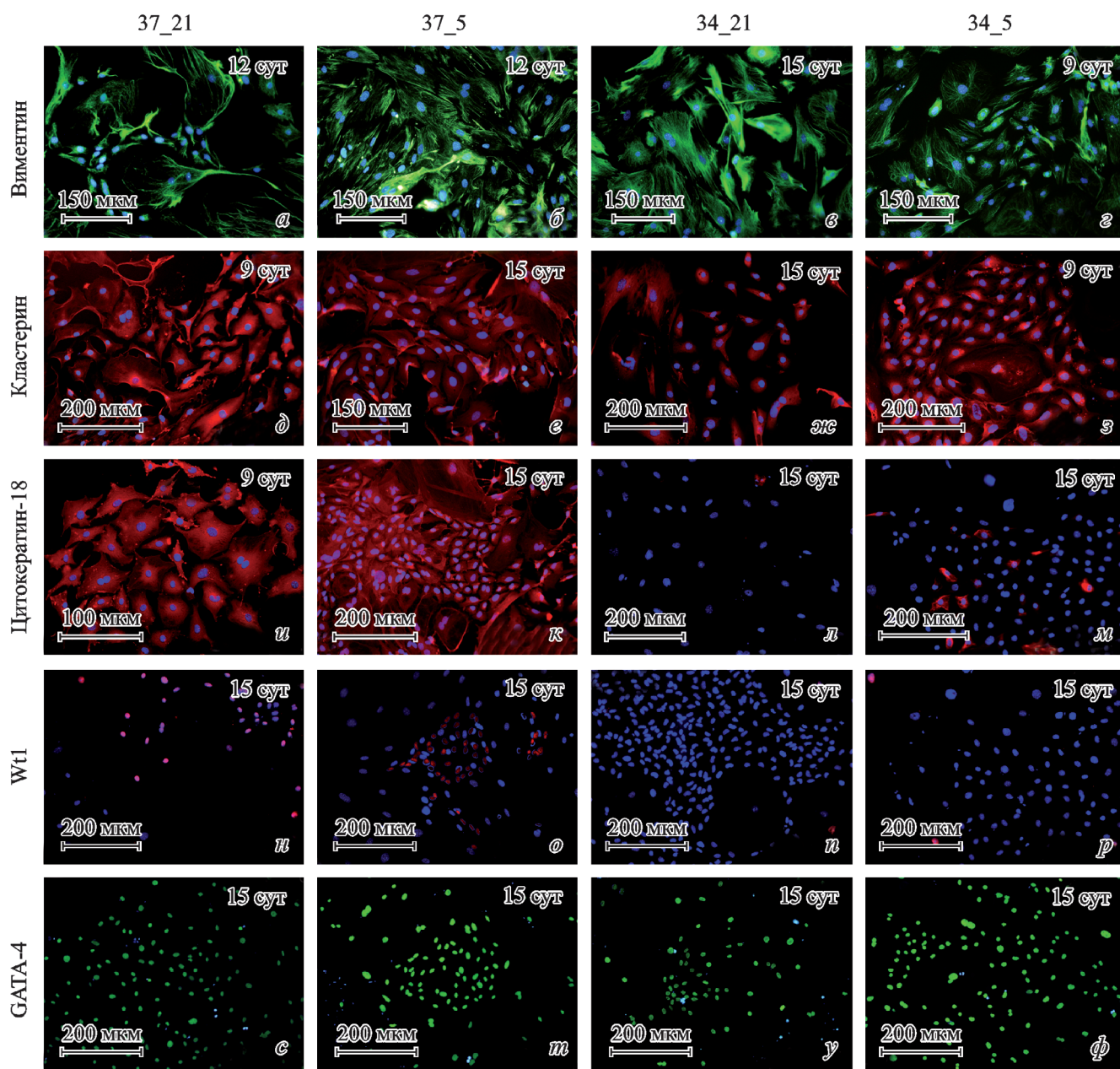


Рис. 7. Экспрессия основных маркеров КС (зеленый и красный цвета) по данным иммунофлуоресцентного анализа при четырех условиях культивирования.

Синий цвет — окраска ядер DAPI.

показало, что доля BrdU⁺/кластерин⁺-клеток значительно превышает долю BrdU⁺/кластерин⁻-клеток во всех типах культуры и возрастает с 3-х по 15-е сут культивирования. Такая же картина наблюдалась в культурах 37_21 и 37_5 при исследовании экспрессии цитокератина-18 и включения клетками BrdU. Напротив, в культурах 34_21 и 34_5 начиная с 3-х и 9-х сут наблюдения соответственно в пролиферацию вступали преимущественно цитокератин-18⁺-КС (рис. 8, б). На 3-и и 9-е сут во всех вариантах культуры в основном пролиферировали Wt1⁺-КС (рис. 8, в). На 15-е сут наблюдения картина изменялась: в культурах 37_21 и 37_5 в большей степени начали включать BrdU Wt1⁺-КС, а в культурах 34_21 и 34_5, напротив, Wt1⁺/BrdU⁺-клетки исчезали вообще.

Обсуждение

По данным об экспрессии кластерина, виментина, Gata-4 и α -актина видно, что во всех четырех вариантах культивирования уже на 3-и сут большую часть клеток в культуре составляют КС, а к 15-м сут их содержание достигает почти 100 %. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание на маркеры КС (кластерин и Wt1) и BrdU однозначно свидетельствует о пролиферации КС во всех культурах. КС активно пролиферируют: доля клеток, включающих BrdU, доходит до 30 %. Число клеток по ходу культивирования растет, делящиеся клетки образуют скопления (колонии). К 15-м сут клетки формируют монослой, и рост культур прекращается из-за контактного ингибирования пролиферации.

Однако все четыре варианта культуры различаются как по динамике роста, так и по экспрессии, характерных для белков КС.

При культивировании при пониженном содержании кислорода доля BrdU⁺-клеток, а также общее число клеток и суммарная площадь колоний КС выше, чем в условиях нормоксии. Это свидетельствует о повышенном росте КС в условиях пониженного содержания кислорода. Содержание в газовой среде с 5 % кислорода при культивировании клеток имитирует условия, в которых клетки находятся *in vivo*: в тканях содержание кислорода составляет в среднем всего 3 %. Для фибробластов мыши и человека показано, что их культивирование в условиях нормального содержания кислорода в атмосфере (21 %) ведет к повреждению ДНК в результате возникающего окислительного стресса, к нарушениям хромосом и появлению точечных мутаций, что в свою очередь приводит к снижению жизнеспособности культуры и репликативному старению. Культивирование при пониженном содержании кислорода, напротив, способствует повышенному росту фибробластов и более длительному содержанию их в культуре (Chen et al., 1995; Parrinello et al., 2003). Те же закономерности, очевидно, действуют и для КС.

Необходимо отметить, что повышенная температура также способствует росту культуры КС, хотя и в меньшей степени, чем концентрация кислорода. В культуре 37_5 число клеток на 9, 12 и 15-е сут выше, чем в культуре 34_5. Судя по кривой роста культуры 37_5, не исследовавшейся на включение BrdU, максимум ее пролиферативной активности приходится на промежуток между 3-ми и 9-ми сут; на 9-е сут число клеток в этой культуре уже настолько велико, что их пролиферация снижается. Зависимость роста клеток от температуры культивирования прослеживается и для КС, содержащихся в условиях нормоксии. На 9-е сут число клеток в культуре 37_21 выше, чем в 34_21. Однако впоследствии различия между этими двумя культурами исчезают из-за пониженной жизнеспособности КС в культуре 37_21. Вероятно, повышенная температура усугубляет окислительный стресс, вызванный атмосферной концентрацией кислорода в среде. Температура культивирования влияет не только на рост КС, но и на экспрессию ими характерных белков-маркеров.

Цитокератин-18 — белок промежуточных филаментов, экспрессирующийся недифференцированными КС в норме. Во многих исследованиях доказано возобновление экспрессии цитокератина-18 КС половозрелых животных в ответ на повышение температуры *in vivo* (при экспериментальном крипторхизме, тепловом шоке) и при кратковременном нагревании КС до 43 °C *in vitro*. Показано, что при повышении температуры в клетках активируется ERK1/2-киназный каскад, который в свою очередь запускает экспрессию цитокератина-18 (Zang et al., 2006). В настоящей работе получены данные о том, что КС экспрессируют цитокератин-18 и при культивировании при 37 °C. На 15-е сут культивирования практически 100 % КС из культур 37_21 и 37_5 экспрессируют этот белок. В культурах, выращенных при 34 °C, содержание цитокератин-18⁺-клеток составляет только 30 (34_5) и 10 (34_21) %. Интересен тот факт, что в культуре 34_5 на 3-и сут содержание цитокератин-18⁺-клеток высоко и составляет 80 %, а затем оно снижается по ходу культивирования до 30 %. Снижение экспрессии цитокератина-18 с 80 до 30 % происходит и в культуре 34_21. Возможно, в ходе получения первичной культуры КС какие-то факто-

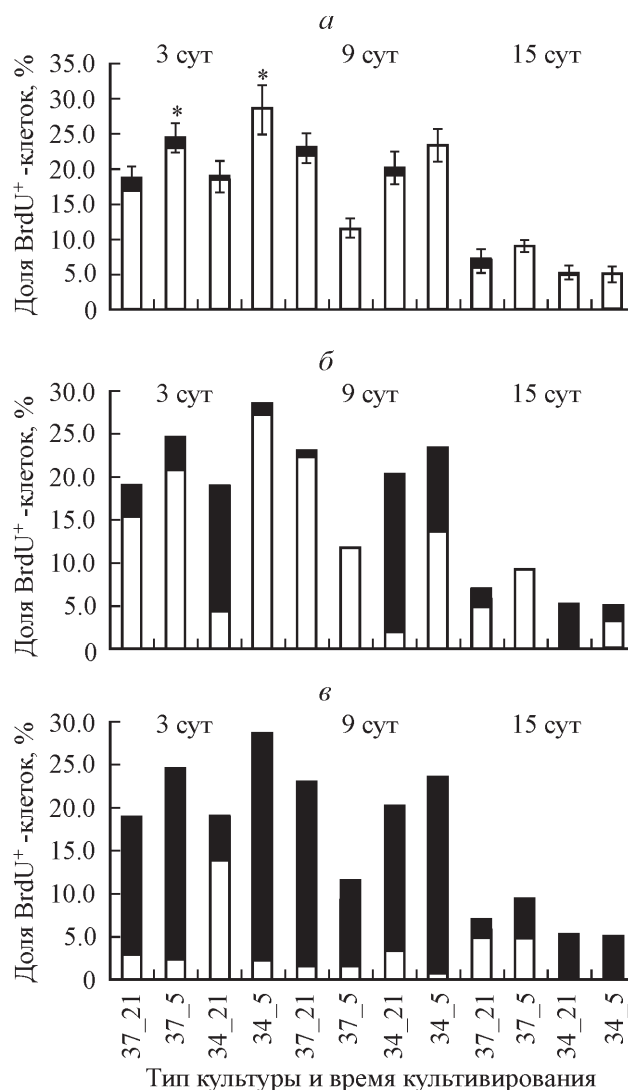


Рис. 8. Динамика изменения доли клеток, меченных BrdU, экспрессирующих (светлая часть столбика) и не экспрессирующих (черная часть столбика) различные маркеры КС при четырех условиях культивирования.

Маркеры КС: а — кластерин, число BrdU⁺-клеток при низком содержании кислорода больше, чем при стандартном содержании кислорода (показано звездочкой, $P < 0.05$); б — цитокератин-18, в — Wt1. Величина столбиков для одной и той же культуры одинакова на всех гистограммах и отражает среднее число BrdU⁺-клеток на различных сроках культивирования.

ры запускают экспрессию этого белка, но поддерживать ее она может только при дальнейшем культивировании в условиях повышенной температуры. Напротив, в ходе культивирования при 34 °C цитокератин-18⁺-клетки большей частью не пролиферируют и постепенно удаляются из популяции.

Белок опухоли Вилмса 1 (Wilms' tumor protein 1, или Wt1) — ключевой транскрипционный фактор, экспрессирующийся КС в ходе и эмбрионального, и постнатального развития, а также и во взрослом состоянии. Отключение его функции у КС сразу после детерминации пола приводит к нарушению образования половых тяжей и гибели половых клеток (Gao et al., 2006). Во взрослом состоянии отсутствие Wt1 ведет к снижению экспрессии белков адгезивных контактов (adherence junctions) и апоптозу половых клеток (Rao et al., 2006). На 3—9-е сут

культивирования во всех вариантах культуры содержание Wt1⁺-клеток низкое (только 10—20 %). Но к 15-м сут оно повышается в культурах, содержащихся при 37 °C: до 60 % в культуре 37_21 и до 30 % в культуре 37_5. Причем по данным иммунофлуоресцентного анализа видно, что экспрессировать Wt1 начинают мелкие активно пролиферирующие КС, образующие колонии. Это объясняет, почему содержание таких клеток выше в культуре 37_21: к 15-м сут в этой культуре большая часть клеток, не формирующих колоний, погибает.

Низкая экспрессия Wt1 в начале культивирования, когда клетки в основном лежат отдельно, и ее возобновление в части клеток в колониях при достижении конfluence состояния наводят на мысль о связи экспрессии Wt1 с формированием межклеточных контактов. Это соответствует и данным литературы по нарушению контактов между КС после отключения функции Wt1 (Rao et al., 2006). Неясной остается связь возобновления экспрессии Wt1 с повышенной температурой культивирования. Однако возможно, что этот белок начинает экспрессироваться только при достижении колониями КС определенного критического размера. Действительно, в культурах 34_5 и 34_21 средняя площадь колоний на 15-е сут меньше, чем в культурах 37_5 и 37_21.

На основании вышесказанного можно заключить, что КС, выделенные из половозрелых мышей, проявляют высокую пластичность в культуре, изменяя свои свойства при изменении условий культивирования. Как и многие другие типы клеток, КС лучше растут и более жизнеспособны при пониженном содержании кислорода в среде. Повышение температуры культивирования до 37 °C также ускоряет рост КС и, кроме того, поддерживает в этих клетках экспрессию маркера дедифференцировки цитокератина-18. При повышенной температуре возобновляет экспрессию и Wt1 — важный транскрипционный фактор, определяющий функциональные свойства КС.

Таким образом, в условиях повышенной температуры культивирования нами получены активно пролиферирующие дедифференцированные КС. Определение их функциональных свойств требует дальнейших исследований, но данные об экспрессии Wt1 и морфологии культуры позволяют предполагать способность этих клеток поддерживать развитие половых клеток. Кроме того, то, что эти клетки становятся дедифференцированными, возможно, означает приобретение ими морфогенетического потенциала. Показано, что недифференцированные КС, полученные от неонатальных животных, а также КС, дедифференцированные в условиях экспериментального крипторхизма, способны при трансплантации формировать новые семенные каналы и поддерживать в них развитие половых клеток (Малолина и др., 2011; Малолина, Кулибин, 2012). Если таким свойством будут обладать и культивируемые КС, которые проще получить и размножить *in vitro*, они смогут оказаться полезными как для репродуктивной биологии, так и для регенеративной медицины.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-32182 мол а).

Список литературы

- Буравкова Л. Б., Гринаковская О. С., Андреева Е. Р., Рылова Ю. В. 2009. Модификация свойств мезенхимальных стро-
мальных клеток из жировой ткани с помощью снижения содержания кислорода в среде культивирования. В кн.: Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные исследования и перспективы клинического применения. М.: Литтерра. 125—146.
- Малолина Е. А., Кулибин А. Ю. 2012. Повышение регенерационного потенциала клеток Сертоли вследствие теплового воздействия. Молекуляр. мед. (4) : 49—57.
- Малолина Е. А., Кулибин А. Ю., Маршак Т. Л., Захаров С. Т. 2011. Регенеративный потенциал трансплантированных клеток Сертоли взрослых мышей. Бюл. эксперим. биол. и мед. 151 (5) : 585—588.
- Ahmed E. A., Barten-van Rijbroek A. D., Kal H. B., Sadri-Ardekani H., Mizrak S. C., van Pelt A. M. M., de Rooij D. G. 2009. Proliferative activity *in vitro* and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. Reproduction. 80 (6) : 1084—1091.
- Appert A., Fridmacher V., Locquet O., Magre S. 1998. Patterns of keratins 8, 18 and 19 during gonadal differentiation in the mouse: sex- and time-dependent expression of keratin 19. Differentiation. 63 : 273—284.
- Basciano L., Nemos C., Foliguet B., de Isla N., de Carvalho M., Tran N., Dalloul A. 2011. Long term culture of mesenchymal stem cells in hypoxia promotes a genetic program maintaining their undifferentiated and multipotent status. BMC Cell Biol. 30 : 1—12.
- Buganim Y., Itskovich E., Hu Y. C., Cheng A. W., Ganz K., Sarkar S., Fu D., Welstead G. G., Page D. C., Jaenisch R. 2012. Direct reprogramming of fibroblasts into embryonic Sertoli-like cells by defined factors. Cell Stem Cell. 11 (3) : 373—386.
- Chen M., Cai H., Yang J.-L., Lu C.-L., Liu L., Yang W., Guo J., Hu H.-Q., Fan C.-H., Hu Z.-Y., Fan H., Hu Z.-Y., Gao F., Liu Y.-X. 2008. Effect of heat stress on expression of junction-associated molecules and upstream factors androgen receptor and wilms' tumor 1 in monkey Sertoli cells. Endocrinology. 149 (10) : 4871—4882.
- Chen Q., Fischer A., Reagan J. D., Yan L. J., Ames B. N. 1995. Oxidative DNA damage and senescence of human diploid fibroblast cells. PNAS. 92 (10) : 4337—4341.
- Chui K., Trivedi A., Cheng C. Y., Cherbavaz D. B., Dazin P. F., Huynh A. L., Mitchell J. B., Rabinovich G. A., Noble-Haeusslein L. J., John C. M. 2011. Characterization and functionality of proliferative human Sertoli cells. Cell Transplantation. 20 (5) : 619—635.
- Forristal C. E., Wright K. L., Hanley N. A., Oreffo R. O., Houghton F. D. 2010. Hypoxia inducible factors regulate pluripotency and proliferation in human embryonic stem cells cultured at reduced oxygen tensions. Reproduction. 139 (1) : 85—97.
- Gao F., Maiti S., Alam N., Zhang Z., Deng J. M., Behringer R. R., Lecureuil C., Guillon F., Huff V. 2006. The Wilms tumor gene, Wt1, is required for Sox9 expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis. PNAS. 103 : 11 987—11 992.
- Parrinello S., Samper E., Krtolica A., Goldstein J., Melov S., Campisi J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. Nat. Cell Biol. 5 (8) : 741—747.
- Pitetti J. L., Calvel P., Zimmermann C., Conne B., Papaioannou M. D., Aubry F., Cederroth C. R., Urner F., Fumel B., Crausaz M., Docquier M., Herrera P. L., Pralong F., Germond M., Guillon F., Jégou B., Nef S. 2013. An essential role for insulin and Igf1 receptors in regulating Sertoli cell proliferation, testis size, and FSH action in mice. Mol. Endocrinol. 27 (5) : 814—827.
- Rao M. K., Pham J., Imam J. S., MacLean J. A., Murali D., Furuta Y., Sinha-Hikim A. P., Wilkinson M. F. 2006. Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis. Genes Develop. 20 : 147—152.
- Sato Y., Yoshida K., Nozawa S., Yoshiike M., Arai M., Otoi T., Iwamoto T. 2013. Establishment of adult mouse Sertoli cell lines by using the starvation method. Reproduction. 145 (5) : 505—516.
- Skinner M. K., Griswold M. D. 2005. Sertoli cell biology. Amsterdam; Boston: Elsevier Acad. Press. 494 p.
- Tremblay J. J., Viger R. S. 1999. Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through

a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Molecular Endocrinology*. 13 (8) : 1388—1401.

Viger R. S., Mertineit C., Trasler J. M., Nemer M. 1998. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter. *Development*. 125 (14) : 2665—2675.

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. 2006. Dedifferentiation of adult monkey sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase 1/2 induced by heat treatment. *Endocrinology*. 147 : 1237—1245.

Zhang Z.-H., Hu Z.-Y., Song X.-X., Xiao L.-J., Zou R.-J., Han C.-S., Liu Y.-X. 2004. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism. *Intern. J. Androl*. 27 : 234—239.

Поступила 13 VI 2013

CHARACTERIZATION OF CULTURED SERTOLI CELLS UNDER HIGH-TEMPERATURE AND HYPOXIC CONDITIONS

A. Yu. Kulibin,¹ E. A. Malolina²

¹ Koltzov Institute of Developmental Biology, RAS and ² D. I. Ivanovsky Institute of Virology Ministry of Health and Social Development of the Russian Federation, Moscow;

¹e-mail: Kulibin.A. BKRJ@gmail.com

Sertoli cells (SCs) isolated from adult C57Bl/6 mice were characterized under four different cell culture conditions: standard conditions (34 °C, 21 % O₂ — 34_21), high-temperature conditions (37 °C, 21 % O₂ — 37_21), hypoxic conditions (34 °C, 5 % O₂ — 34_5), and combination of these conditions (37 °C, 5 % O₂ — 37_5). Proliferation and viability were promoted when SCs were grown under hypoxia: 28.5 and 24.6 % of SCs were BrdU-positive at the peak of proliferation, 92.7 and 92.7 % of SCs were viable after 15 days in culture at 34_5 and 37_5, respectively, versus 20.2 and 88.9 % at 34_21, respectively. In SCs grown under high-temperature conditions proliferation was slightly increased, but viability was decreased: 23.1 % of SCs were BrdU-positive, and only 74.9 % of SCs were viable at 37_21. At the same time cultivation of SCs at 37 °C promoted their dedifferentiation: after 15 days in culture 98.8 and 98.6 % of cells at 37_5 and 37_21, respectively, expressed a marker of immature SCs — cytokeratin-18, compared to 26.5 % at 34_5 and 6.6 % at 34_21. Expression of Wt1, a transcription factor controlling cell-cell junction formation and germ cell development, disappeared in most cells after 3 days in culture under all culture conditions. However, SCs forming colonies restored Wt1 expression at day 15 in culture under high-temperature conditions: 59.1 and 29.5 % of SCs were Wt1-positive at 37_21 and 37_5, respectively, versus 11.1 and 3.6 % at 34_21 and 34_5, respectively. Cultured SCs expressed other SC markers (vimentin, clusterin, Gata-4) under all culture conditions. Our results show that cultured SCs may be useful for reproductive biology and regenerative medicine.

Key words: Sertoli cells, hypoxia, high-temperature conditions, cytokeratin-18, Wt1.