

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ СПЕРМАТОГОНИЙ ХРЯКА НА КЛЕТКАХ СЕРТОЛИ

© И. П. Савченкова,¹ С. А. ВасильеваВсероссийский научно-исследовательский институт
экспериментальной ветеринарии им. Я. П. Коваленко, Москва, 109428;¹ электронный адрес: s-ip@mail.ru

Изучали *in vitro* влияние клеток Сертоли на сперматогонии хряка, которые были выделены из тестикул помесных хряков 60-суточного возраста. Для обогащения культуры сперматогониями клетки очищали центрифугированием в разных градиентах плотности, используя прерывистый градиент Перколл, с последующим разделением клеток по адгезии. В клетках Сертоли хряка обнаружены липидные капли, которые окрашивались жировым красным О. Эксперименты показали, что культивирование сперматогоний хряка в присутствии клеток Сертоли (вплоть до 35 сут) приводит к их дифференцировке так же, как и в естественных условиях в яичке. На 10-е сут культивирования клетки объединяются в группы, формируются цепочки и суспензионные кластеры сперматогенных клеток. В это время формируются сперматогенные колонии, которые анализировали по экспрессии генов *Nanog* и *Plzf* с помощью ПЦР в реальном времени. Экспрессия гена *Nanog* в экспериментальных клеточных клонах, полученных при краткосрочном культивировании сперматогониевых клеток в присутствии клеток Сертоли, превышала экспрессию этого гена в свежеизолированных сперматогониевых клетках в 200 раз. Продукт экспрессии гена *Plzf* обнаружен как в свежеизолированных половых клетках, так и в полученных клеточных клонах *in vitro*. При более длительном культивировании сперматогоний на клетках Сертоли наблюдали процесс дифференцировки *in vitro* в направлении сперматогенеза и формирование единичных подвижных спермиев хряка на 30—33-и сут. На этом этапе клеточная популяция характеризовалась гетерогенностью. Дифференцировка сперматогониевых клеток хряка без клеток Сертоли останавливалась в культуре на 7-е сут культивирования. Результаты демонстрируют, что культивирование сперматогоний хряка на клетках Сертоли способствует их дифференцировке в направлении сперматогенеза *in vitro* и может облегчить получение культуры половых клеток хряка.

Ключевые слова: сперматогенез, тестикулы хряка, сперматогониевые клетки, клетки Сертоли, фидерный слой, дифференцировка, экспрессия генов.

Принятые сокращения: СКПК — сыворотка крови плодов коров, СК — стволовые клетки, СпСК — сперматогониевые СК, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ФСГ — фолликулостимулирующий гормон, EGF — фактор роста эпидермиса, FGF — фактор роста фибробластов, GDNF — глиальный нейротрофический фактор, клетки IL — интерлейкин, LIF — фактор, ингибирующий лейкомию, *Nanog* — транскрипционный фактор, SCF — фактор стволовых клеток, *Plzf* — транскрипционный репрессор (promyelocytic leukemia zinc-finger).

Сперматогенез млекопитающих поддерживается многочисленной популяцией сперматогониевых стволовых клеток (СпСК), представленных сперматогониями типа А (A_0 или A_s), которые располагаются на базальной мембране внутри семенных канальцев и обладают способностью к самообновлению и дифференцировке, что обеспечивает непрерывную продукцию спермиев в течение всей жизни взрослой особи (De Rooij, Russell, 2000; De Rooij, Griswold, 2012). В последние годы мужские половые стволовые клетки (СК) снова привлекли внимание из-за разработки двух методологий. Во-первых, серией успешных экспериментов было показано, что СпСК у грызунов можно длительно поддерживать в культуре. Так, появились сообщения о культивировании сперматогоний мыши, крысы и хомяка, которые были названы линиями половых СК (Kanatsu-Shinohara et al., 2003, 2008; Nagano et al., 2003; Ryu et al., 2005). Во-вторых, было

установлено, что СпСК, которые находятся длительное время *in vitro*, при переносе в семенник реципиента с выключенным сперматогенезом способны возобновить экзогенный сперматогенез (Brinster, Zimmermann, 1994; Dobrinski, 2005).

Ценность исследований определяется не только их значением для изучения биологии СпСК, но и возможностью получения новых знаний, представляющих интерес для регенерации тканевой системы: преодоление мужского бесплодия, изучение последствий действия повреждающих факторов окружающей среды, радио- и химиотерапии. Выделение, культивирование и трансплантация СпСК млекопитающих открывают перспективы в исследованиях фундаментальных аспектов сперматогенеза. Создание линий половых СК позволит решить проблему сохранения редких и исчезающих видов животных. Разработка и оптимизация условий поддержания спермато-

гоний типа А хряка *in vitro* являются актуальными для сельскохозяйственной биотехнологии, в первую очередь для создания трансгенных животных.

Трансгенные свиньи представляют собой перспективный материал для решения многих медико-биологических проблем, в том числе могут рассматриваться как потенциальный источник тканей и органов для ксено-трансплантации человеку. Наличие стабильной культуры половых клеток хряка актуально для ветеринарной биотехнологии. Известно, что многие вирусы обладают тропизмом к половым клеткам. В связи с этим СпСК хряка представляют собой новую клеточную систему для вирусологических исследований. Однако линии половых СК хряка еще не созданы. Одной из причин этого является недостаточное знание условий культивирования сперматогоний типа А хряка и влияния различных факторов роста на половые клетки *in vitro*.

Первое сообщение о выделении сперматогоний типа А из яичек 80-суточного возраста йоркширских хряков появилось в 1999 г. (Dirami et al., 1999). Было показано, что среда KSOM, содержащая фактор стволовых клеток (SCF) и колониестимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов, способствует выживанию и пролиферации типа А сперматогоний *in vitro* в течение 120 ч. Потом описали несколько факторов, которые влияют на сперматогонию хряка в культуре и показали, что сыворотка крови плодов коров (СКПК) и внеклеточный матрикс (ВКМ) играют важную роль в поддержании этих клеток *in vitro* (Marret, Durand, 2000). Другие авторы (Luo et al., 2006) продемонстрировали возможность культивирования сперматогоний хряка более длительное время (до 2 нед) в простой среде без дополнительных факторов. Сперматогонии хряка в культуре также изучались и в других работах (Савченкова и др., 2006, 2011, 2012; Han et al., 2009; Kuijk et al., 2009).

Считается, что ростовые факторы играют важную роль в поддержании сперматогониевых клеток (De Rooij, Mizrak, 2008). Среди них выделяют глиальный нейротрофический фактор (GDNF), фактор стволовых клеток (SCF), фактор, ингибирующий лейкемию (LIF), фактор роста фибробластов (FGF), фактор роста эпидермиса (EGF). Соматические клетки тестикул млекопитающих продуцируют многие из этих факторов. Паракринная регуляция осуществляется на уровне гонад и включает в себя сеть взаимодействий между основными клетками семенника: клетками Сертоли, клетками Лейдига, перитубулярными мышечными клетками и половыми клетками, расположенными в семенном канальце и, возможно, клетками кровеносных сосудов. Согласно современным представлениям, регуляция самообновления и дифференцировки СпСК — сложный процесс, в котором важную роль играют клетки Сертоли. Они являются своеобразными медиаторами взаимодействий между соматическими и половыми клетками организма.

Клетки Сертоли воспринимают регуляторные сигналы как со стороны соматических, так и со стороны половых клеток и в ответ на них синтезируют факторы, которые, с одной стороны, поддерживают развитие половых клеток, а с другой — образуют обратную связь как на уровне гонады, так и на уровне всей гипоталамо-гипофизарно-гонадной оси в целом. Считается, что клетки Сертоли играют ключевую роль в детерминации мужских половых стволовых клеток и их дифференцировке в направлении сперматогенеза (Chen, Liu, 2015). В различных исследованиях *in vitro* было показано, что культивирова-

ние ранних половых клеток в присутствии клеток Сертоли и гормонов приводит к индукции постмейотического развития и созреванию сперматоцитов или сперматид (Lee et al., 2001; Sousa et al., 2002). Тезарик с соавторами (Tesarik et al., 2000) показали, что культивирование половых клеток человека на клетках Сертоли способствует запуску сперматогенеза в течение короткого периода культивирования. Было показано, что наличие этих клеток необходимо для успешной дифференцировки сперматогоний человека в спермии *in vitro* (Sofikitis et al., 2005).

Целью нашей работы было изучить влияние клеток Сертоли на сперматогонию хряка *in vitro* и их способность индуцировать дифференцировку ранних половых клеток в направлении сперматогенеза.

Материал и методика

Все реактивы, исключая указанные, были получены от фирмы Sigma (США).

В экспериментах использовали семенники 60-суточных хряков (масса яичек с придатком составляла не больше 20 г) местной помесной породы (крупная белая × Ландрас). Кастрацию животных проводили под местной анестезией. Для инфильтрационной анестезии подкожной клетчатки животных использовали 0.5%-ный, а для проводниковой анестезии семенных канатиков 2%-ный раствор новокаина. После кастрации семенники в холодном (4 °С) PBS с антибиотиками транспортировали в лабораторию. После макроскопической оценки и взвешивания семенники промывали трижды и удаляли оболочки. После декапсуляции тестикулы обрабатывали механически, а затем ферментативно в течение 40 мин при 37 °С раствором коллагеназы IV типа (Gibco, Invitrogene, Life Technologies, США). Конечная концентрация коллагеназы на основе среды ДМЕМ (Gibco, Invitrogene, Life Technologies, США) составляла 1 мг/мл. Действие коллагеназы нейтрализовали эквивалентным объемом среды ДМЕМ, которая содержала 5 % СКПК (FBS, HyClone, Perbio, Бельгия). Клетки осаждали высокоскоростным центрифугированием при 1000 g в течение 10 мин. К осадку добавляли ДМЕМ, тщательно разбивали до получения однородной клеточной суспензии, а затем пропускали последовательно через нейлоновые ситечки с размерами пор 80 и 40 мкм для удаления соматических клеток.

Очистку сперматогоний выполняли по описанной методике (Gang et al., 2005). Перколл разбавляли PBS для получения его в разных концентрациях — 19, 27, 35 и 43 %. Перколл (2 мл в каждой концентрации) вносили последовательно на дно 15-миллилитровой стерильной центрифужной пробирки (от более высокой концентрации к низкой). Клеточную суспензию насаивали осторожно на верхний слой градиента Перколла и осаждали центрифугированием (800 g, 30 мин). Клетки собирали между градиентами Перколла 27 и 35 %, промывали дважды PBS, разбавляли в ростовой среде и высевали в чашки Петри в концентрации $3 \cdot 10^4/\text{см}^2$. Основной средой для культивирования сперматогоний была среда ДМЕМ, содержащая 4.5 г/л глюкозы, 10 % СКПК и 1 % смеси стрептомицина и пенициллина (Gibco, США). Далее для очистки полученных сперматогоний от других клеточных типов использовали методический прием, основанный на разных адгезивных способностях клеток. После непродолжительного культивирования (2 ч) в чашках Петри, покрытых

Праймеры и зонды, используемые при ПЦР в реальном времени

Ген	Олигонуклеотид (направление 5'—3')	Номер последовательности РНК (по: GenBank)	Длина ампликона, п. о.
<i>ФГА-ДГ (GH)</i>	<i>GH_F</i> : TCG-GAG-TGA-ACG-GAT-TTG-GC <i>GH_R</i> : GGA-AGA-TGG-TGA-TGG-GAT-TTC-C <i>GH_Z</i> : FAM-CGC-CTG-GTC-ACC-AGG-GCT-G-RTQ1	AF017079.1	215
<i>Nanog (NG)</i>	<i>NG_F</i> : ACA-ATC-CAG-CTC-TTT-GGT-GGT-TT <i>NG_R</i> : TGA-CAT-CTG-CAA-GGA-GGC-ATA-ATT-T <i>NG_Z</i> : FAM-TGG-AAA-TGG-ATG-CTT-CGG-GGC-A-RTQ1	NM001129971.1	174
<i>Plzf (PL)</i>	<i>PL_F</i> : AAA-GCG-GTT-CCT-GGA-TAG-TTT-G <i>PL_R</i> : GGT-CTG-CCT-GTG-TGT-CTC <i>PL_Z</i> : FAM-CTC-ATT-CAG-CGG-GTG-CCA-AAG-C-RTQ1	AK350495.1	132

Примечание. ФГА-ДГ — глицеральдигид-3-фосфатдегидрогеназа, F — прямой праймер, R — обратный праймер, Z — зонд; п. о. — пара оснований.

0.1%-ным раствором желатина, неприкрепившиеся клетки переносили в центрифужные пробирки и осаждали (200 g, 10 мин). Очищенные клетки, обогащенные сперматогониями, культивировали при 37 °C и 5 % CO₂.

Клетки Сертоли собирали между градиентами Перколла 19 и 27 %. Для выявления липидных пузырьков клетки фиксировали ледяным метанолом и окрашивали жировым красным O в течение 10—15 мин. Для приготовления фидерных слоев клетки Сертоли высевали в чашки Петри и инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂. Когда клетки достигали 90%-ного монослоя, их обрабатывали митомицином C (в конечной концентрации 30 мкг/мл) в течение 3 ч, затем трижды отмывали раствором PBS и добавляли ростовую среду. На следующий день клетки Сертоли с заблокированным митозом использовали для культивирования сперматогоний.

Для подтверждения отсутствия в полученной клеточной популяции клеток крови часть клеток после очистки окрашивали поликлональными антителами против CD45. В качестве вторых антител использовали меченный пероксидазой антикроличий IgG (Becton Dickinson, США) в разведении 1 : 10. Клетки оценивали с помощью фазово-контрастного микроскопирования на микроскопе Carl Zeiss с программным обеспечением Axio Vision Rel. 4.8.

Клеточные клоны анализировали на наличие продукта экспрессии генов *Nanog* и *Plzf* (promyelocytic leukemia zinc-finger) в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени. В качестве контроля реакции использовали мРНК гена *ФГА-ДГ* (глицеральдигид-3-фосфатдегидрогеназа). Суммарную РНК из клеток выделяли с помощью набора Mini RNA Isolation II Kit ZymoResearch (США). Элюцию проводили в 30 мкл воды. Для обработки ДНКазой готовили реакционную смесь в объеме 10 мкл, которая включала в себя 1 мкг выделенной РНК, 1 мкл 10-кратного реакционного буфера, содержащего MgCl₂, 1 ед. ДНКазы (Fermentas, Литва) и 10 ед. ингибитора РНКазы (RiboLock, Fermentas, Литва). Инкубировали в течение 30 мин при 37 °C. ДНКазу инактивировали путем добавления 1 мкл 50 мМ ЭДТА и последующего инкубирования при 65 °C в течение 10 мин.

Обратную транскрипцию осуществляли следующим образом. К 10 мкл подготовленного раствора РНК добавляли 1 мкл смеси гексамерных праймеров (Random Hexamer Primer, Fermentas, Литва), инкубировали при 70 °C в течение 5 мин и реакционную смесь ставили на 2 мин в

лед. Затем в 11 мкл раствора, содержащего РНК и смесь гексамерных праймеров, вносили 8.5 мкл реакционной смеси для обратной транскрипции, которая содержала 4 мкл 5-кратного реакционного буфера, 1 мМ каждого из дНТФ (R0191, Fermentas) и 40 ед. M-MuLV обратной транскриптазы (EP0351, Fermentas). Общую смесь инкубировали 10 мин при 25 °C, затем 60 мин при 42 °C. Сразу после обратной транскрипции реакционную смесь разводили ТЕ-буфером в 2 раза.

Для каждой из исследуемых мишеней готовили индивидуальную реакционную смесь (для проведения ПЦР в реальном времени) в объеме 25 мкл, которая включала в себя 5 мкл матрицы кДНК (5—20 нг), 1-кратный реакционный буфер ПЦР, смесь 2-FRT (Амплисен, Россия), 1 ед. Taq-F-полимеразы (Амплисен, Россия), 200 мкМ каждого из дНТФ (R0191, Fermentas), по 240 нМ прямого и обратного праймеров (Литех, Россия) и 120 нМ зонда (Синтол, Россия). Каждый зонд с 3'-концевого нуклеотида был конъюгирован флуоресцентным красителем FAM, а в качестве тушителя использовали RTQ1. Реакцию проводили на приборе RotorGene 6000 (Corbett Research, Австралия). Температурный профиль амплификации был следующим: 95 °C — 15 мин (предварительная денатурация и активация Taq-F-полимеразы), затем 50 циклов 95 °C — 20 с, 60 °C — 20 с (детекция флуоресцентного сигнала), 72 °C — 20 с. В таблице представлены праймеры и зонды, используемые для амплификации.

Уровень мРНК и количество копий генов оценивали в режиме относительных измерений ($\Delta\Delta C_t$ -метод) (Livak, Schmittgen, 2001). Относительный уровень мРНК представляет собой изменение содержания копий нуклеотидной последовательности (транскрипта) каждого гена в клеточных популяциях, полученных при культивировании на клетках Сертоли *in vitro*, по сравнению со свежееизолированными клетками, выделенными из тестикул 60-суточных хряков той же породы, относительно контрольного гена.

Результаты и обсуждение

Основным критерием классификации сперматогоний хряка в настоящее время является временной фактор, т. е. соответствие циклу семенного эпителия в яичке (Frankenhuis et al., 1982). В отличие от грызунов в тестикулах хряков сперматогонии появляются позже, только к 2-месяч-

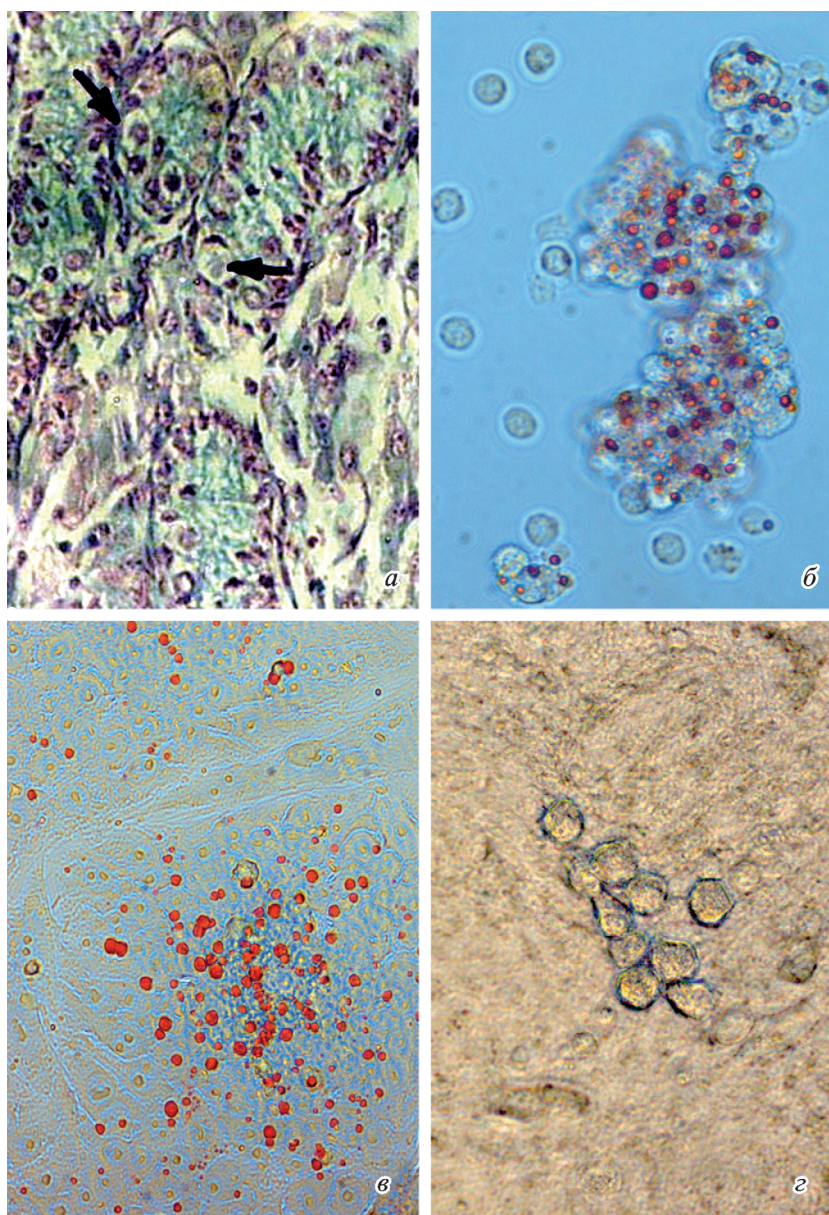


Рис. 1. Морфология сперматогоний и клеток Сертоли, выделенных из семенников хряков 60-суточного возраста.

a — семенник 60-суточного хряка; *стрелками* показаны отдельные и парные сперматогонии; *б, в* — липидные везикулы в клетках Сертоли (*красный цвет*) соответственно в свежесвыделенных и в монослое в культуре, окрашенные жировым красным *O*; *г* — формирование сперматогониевых кластеров через 48 ч культивирования сперматогоний хряка на клетках Сертоли. Об. 20 \times .

ному возрасту (Takagi et al., 1997). К сожалению, имеется недостаточно данных о стадиях и времени перехода гоноцитов в сперматогонии у этого вида животных. Известно, что в процессе дифференцировки гоноциты перемещаются к базальной мембране семенного канальца (Goel et al., 2007). В наших экспериментах идентификацию сперматогоний хряка проводили, учитывая критерии, выдвинутые ранее (De Rooij, Russell, 2000). Результаты проведенных нами гистологических исследований показали, что оптимальным временем для получения культуры клеток, обогащенной сперматогониями типа А хряка, является 60 сут после опороса (Савченкова и др., 2006). В этом возрасте семенные каналцы содержат только сперматогонии типа А, которые могут быть парными (рис. 1, *a*), и клетки Сертоли. Различить внутри клеточной популяции сперматогонии типа А₁-А₄ по морфологии сложно. Сле-

дует отметить, что у хряка до сих пор не найдено специфического гена-маркера, экспрессия которого была бы характерна для СпСК. Из семенников сельскохозяйственных животных выделены сперматогонии барана (Rodriguez-Sosa et al., 2006), хряка (Luo et al., 2006) и быка (Izadyar et al., 2002) при использовании в качестве маркера антител против USHL1. Однако было обнаружено (Luo et al., 2006), что в результате длительного культивирования свиные клетки Сертоли также связывают антитела против USHL. Недавно Ли и соавторы (Lee et al., 2014) охарактеризовали ген *UTF1* (ген транскрипционного фактора 1 недифференцированных эмбриональных клеток) в качестве потенциального маркера для обнаружения ранних недифференцированных сперматогоний и СпСК в семенниках хряка. К сожалению, мы не имели возможности идентифицировать стволовые сперматогонии типа А₀ с

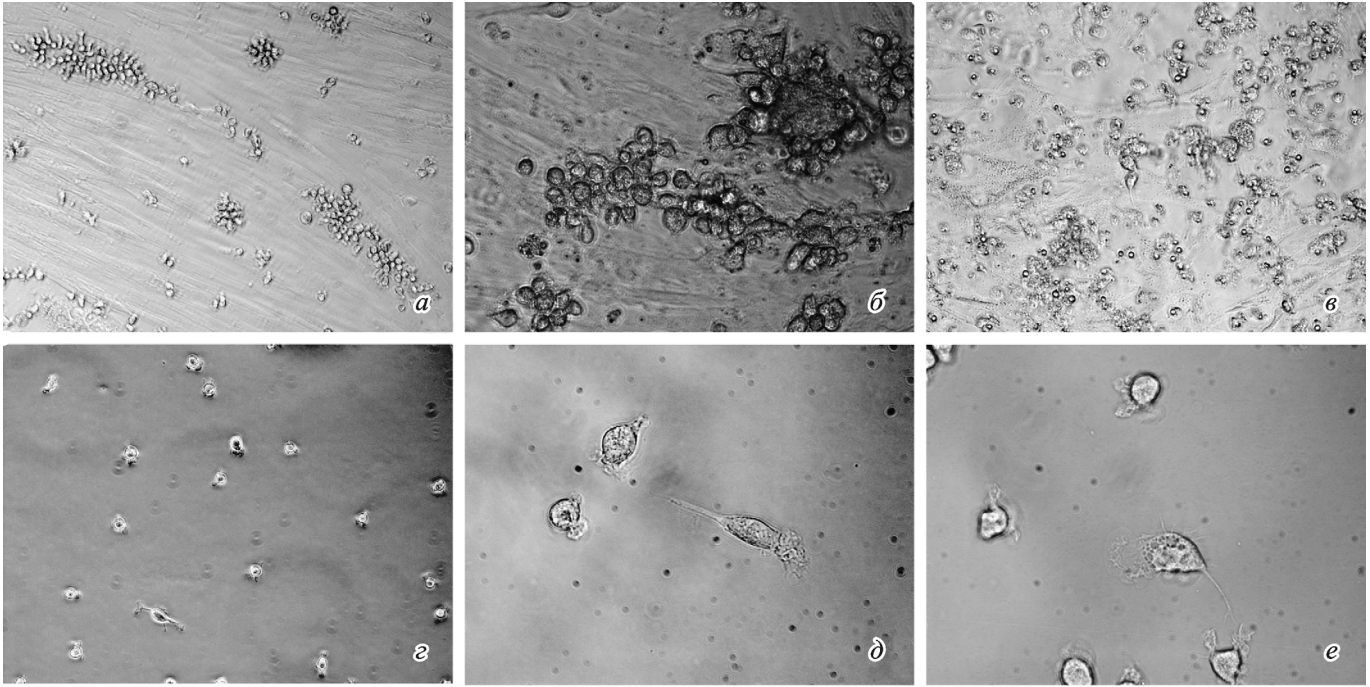


Рис. 2. Дифференцировка сперматогониевых клеток хряка *in vitro*.

a—в — сокультивирование с клетками Сертоли в течение 35 сут; *стрелкой (в)* показан спермий; *г—е* — культивирование без клеток Сертоли на пластиковых чашках Петри в течение 3—7 сут. Об. 10× (*a, в, г*); 20× (*б*) и 40× (*д, е*).

помощью специфических маркеров и предполагаем, что полученная суспензия представлена как стволовыми сперматогониями типа A_0 , так и, возможно, их более дифференцированными потомками (A_1 - A_4).

Несмотря на то что эксперименты по выделению СпСК ведутся давно, следует заметить, что до сих пор существует проблема, которая связана в первую очередь с очисткой половых клеток от соматических. В настоящее время используют несколько способов очистки, среди которых можно выделить разделение в разных градиентах плотности Перколла (Heidari et al., 2014), который мы использовали в своих экспериментах, с последующим разделением клеток по адгезии. Последовательная очистка клеток этими методами позволила добиться получения максимально обогащенной сперматогониями популяции клеток. Связывание полученных клеток антителами против CD45 продемонстрировало отсутствие в клеточной популяции клеток крови.

Мы использовали незрелые клетки Сертоли, выделенные из тестикул неполовозрелого возраста, которые получали из других фракций, разделенных на Перколле. Известно, что незрелые клетки Сертоли митотически активны *in vitro*. Клетки Сертоли прикреплялись к покрытым желатином чашкам Петри, начинали расплываться и приобретать эпителиоподобную морфологию. В результате морфологической визуальной оценки в них обнаружены включения, которые напоминали липидные пузырьки. Окраска клеток жировым красным *О* подтвердила наши наблюдения (рис. 1, *б, в*). Однако по мере увеличения длительности культивирования морфология этих клеток менялась на фибробластоподобную.

Для краткосрочного культивирования сперматогонии высевали в чашки Петри (диаметр 6 мм) с монослоем клеток Сертоли ($3 \cdot 10^4$ кл./см²), митоз которых был предварительно заблокирован митомицином *С*, и культивировали при 37 °С во влажной атмосфере 5 % CO₂ без смены

среды в течение 10 сут. Через 48 ч культивирования сперматогонии прикреплялись к клеткам Сертоли. Визуальный анализ под инвертированным микроскопом показал, что сперматогонии имеют округлую или овальную форму с большим ядром (рис. 1, *г*). Через 72 ч совместного культивирования наблюдали начальные этапы дифференцировки сперматогоний: формирование клеточных кластеров (сфер). Мы обнаружили, что краткосрочное культивирование сперматогоний в присутствии клеток Сертоли приводит к их дифференцировке, как и в естественных условиях внутри семенника. Объединение клеток в группы, формирование цепочек наблюдали на 10-е сут культивирования (рис. 2, *а*). В это же время было отмечено формирование небольших, округлых по форме, приплюснутых клеточных колоний, которые были прочно прикреплены к фидерному слою (рис. 2, *б*).

Эти клеточные колонии мы проанализировали на экспрессию генов *Nanog* и *Plzf* с помощью ПЦР в реальном времени. На рис. 3 представлены графики, отражающие зависимость экспрессии этих генов в клонах, полученных при культивировании на клетках Сертоли *in vitro*, по сравнению со свежеизолированными клетками, выделенными из тестикул 60-суточных хряков той же породы, относительно контрольного гена. В клонах, культивируемых на клетках Сертоли, был обнаружен продукт экспрессии гена *Nanog*, а сама экспрессия этого гена была в 200 раз выше, чем у свежеизолированных сперматогоний хряка. *Nanog* является транскрипционным фактором, который транскрибируется специфично в полипотентных стволовых клетках (Chambers et al., 2003). Его экспрессия выявлена в первичных половых клетках поросят (Goel et al., 2007). Продукт экспрессии гена *Plzf* был обнаружен нами как в свежеизолированных сперматогониях, так и в клонах, формируемых при совместном культивировании сперматогоний на клетках Сертоли хряка с одинаковым уровнем экспрессии. Ген *Plzf* или *ZBTB16* является транс-

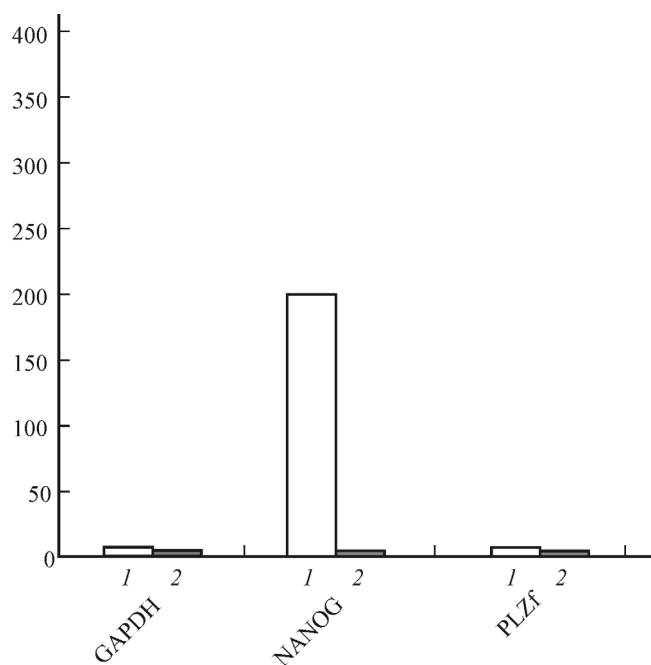


Рис. 3. Количественная оценка экспрессии мРНК генов *Nanog* и *Plzf* методом ПЦР в реальном времени ($\Delta\Delta C_t$ -метод).

Графики отражают зависимость экспрессии генов в клеточных клонах, полученных при культивировании на клетках Сертоли *in vitro* (столбцы 1), по сравнению со свежесозидрованными клетками (столбцы 2), выделенными из тестикул 60-суточных хряков той же породы.

крипционным репрессором и кодирует белок, который участвует в поддержании структуры цинкового пальца при промиелоцитарной лейкемии. Его экспрессия выявлена в гоноцитах и недифференцированных сперматогониях. Считается, что он играет ключевую роль в самообновлении и поддержании пула стволовых сперматогониевых клеток (Vuaas et al., 2004). Было показано, что ген *Plzf* является маркером гоноцитов и СпСК свиней (Goel et al., 2008). В наших экспериментах обнаружение продукта экспрессии этого гена в сперматогониевых клетках хряка, учитывая возраст животного, может свидетельствовать о наличии в них популяции СпСК.

Роль клеток Сертоли в обновлении и дифференцировке сперматогоний хряка *in vitro* изучена недостаточно. Поэтому мы продолжили эксперименты в данном направлении и изучили влияние этих клеток на сперматогонии при более длительном культивировании — в течение 35 сут (время полного цикла сперматогенеза у хряка *in vivo*). Для этого очищенную популяцию сперматогоний высеивали на фидерный слой, представленный клетками Сертоли. На 7-е сут наблюдали объединение клеток в группы, формирование цепочек и суспензионных кластеров сперматогенных клеток, представленных предположительно сперматоцитами I порядка.

Одну часть формируемых суспензионных кластеров сперматогенных клеток переносили на пластик, а другую часть продолжали культивировать в присутствии клеток Сертоли без смены среды. Оказалось, что при более длительном культивировании сперматогенных клеток на клетках Сертоли происходят процесс дифференцировки половых клеток и формирование на 30—33-и сут единичных подвижных спермиев хряка (рис. 2, в). Клеточная популяция на этом этапе характеризовалась гетерогенностью.

При переносе сперматогенных клеток, находящихся в суспензии, в чашки Петри и культивировании их в ростовой среде на пластике в течение 3—5 сут наблюдали формирование жгутика у всех клеток, что могло свидетельствовать об их дифференцировке в удлиненные сперматиды (рис. 2, г—е). Процесс формирования спермиев останавливался через 7 сут культивирования в этих условиях. Можно предположить, что условия культивирования, используемые нами, были недостаточны для завершения процесса дифференцировки и что на этом этапе требуется дополнительное введение в ростовую среду гормонов и ростовых факторов.

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что использование клеток Сертоли на начальных этапах культивирования сперматогоний типа А хряка способствует одновременной пролиферации сперматогоний и их последовательной дифференцировке без добавления в культуру других факторов в течение 35 сут. Наши данные согласуются с данными, полученными у грызунов. Было показано, что взаимодействия между клетками Сертоли и сперматогониями очень важны (Rivarola et al., 1986). К числу ростовых факторов, продуцируемых этими клетками, относятся стволовой фактор роста, активин, инсулиноподобный фактор роста 1, трансформирующий фактор роста, фактор роста семенных канальцев или семенников и ростовой фактор, секретируемый самими клетками Сертоли. Функция этих факторов в сперматогенезе остается неизвестной. Часть факторов и цитокинов продуцируется клетками Лейдига и миоидными клетками, расположенными вокруг семенных канальцев, а также тестикулярными макрофагами, которые могут оказывать влияние на пролиферацию и дифференцировку сперматогоний тоже. В последнее время накапливаются данные о том, что клетки Сертоли продуцируют GDNF (Oatley et al., 2007). Считается, что в тестикулах ФСГ стимулирует продукцию клетками Сертоли GDNF, который является ключевым фактором для поддержания функции СпСК.

Анализ данных, полученных в результате проведенных нами экспериментов, убедительно продемонстрировал важность клеток Сертоли в культуре для поддержания сперматогенеза хряка *in vitro*. С одной стороны, эти результаты могут свидетельствовать в пользу того, что клетки Сертоли способны *in vitro* продуцировать факторы без стимуляции их гормонами. С другой стороны, нельзя исключить факт, что в культуре могут присутствовать в незначительном количестве и другие соматические клетки, например клетки Лейдига или миоидные клетки, которые являются индуктором для клеток Сертоли.

Таким образом, мы показали, что клетки Сертоли играют важную роль в культивировании сперматогоний хряка. Наши данные демонстрируют, что культивирование сперматогоний хряка с клетками Сертоли может индуцировать их дифференцировку в направлении сперматогенеза с формированием спермиев и способствовать получению половых клеток хряка в культуре.

Список литературы

Савченкова И. П., Викторова Е. В., Эрнст Л. К. 2011. Влияние ингибирующей активности дифференцировки, лейкемию (DIA/LIF) и глиального нейротрофического (GDNF) факторов на сперматогенные клетки хряка в культуре. Докл. РАСХН. 4 : 47—50. (Savchenkova I. P., Viktorova E. V., Ernst L. K. 2011. Effect of differentiation inhibiting activity, leukemia inhibitory

(DIA/LIF), and glial cell line neurotrophic (GDNF) factors on boar spermatogenic cells in culture. *Russian Agricultural Sci.* 37 (4) : 333—336.)

Савченкова И. П., Коржикова С. В., Костерева Н. В., Эрнст Л. К. 2006. Культивирование и трансплантация сперматогоний типа А хряков. *Онтогенез.* 37 (4) : 292—300. (Savchenkova I. P., Korzhikova S. V., Kostereva N. V., Ernst L. K. 2006. Cultivation and transfer of porcine type A spermatogonia. *Ontogenez.* 37 (4) : 292—300.)

Савченкова И. П., Полякова М. В., Викторова Е. В., Кулешов К. В. 2012. Длительное культивирование сперматогоний типа А хряка. *Докл. РАСХН.* 5 : 46—49. (Savchenkova I. P., Polyakova M. V., Viktorova E. V., Kuleshov K. V. 2012. Long-term culturing of boar type A spermatogonia. *Russian Agricultural Sci.* 38 (6) : 396—399.)

Brinster R. L., Zimmermann J. W. 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *PNAS.* 91 : 11 298—11 302.

Buaas F. W., Kirsh A. L., Sharma M., McLean D. J., Morris J. L., Griswold M. D., de Rooij D. G., Braun R. E. 2004. Plzf is required in adult male germ cells for stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* 36 : 647—652.

Chambers I., Colby D., Robertson M., Nichols J., Lee S., Tweedie S., Smith A. 2003. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 113 : 643—655.

Chen S. R., Liu Y. X. 2015. Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction.* 149 : R159—R167.

De Rooij D. E., Griswold M. D. 2012. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *J. Androl.* 33 : 1085—1095.

De Rooij D. G., Mizrak S. C. 2008. Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development.* 135 : 2207—2213.

De Rooij D. G., Russell L. D. 2000. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *J. Androl.* 21 : 776—798.

Dirami G., Ravindranath N., Pursell V., Dym M. 1999. Effects of stem cell factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor on survival of porcine type A spermatogonia cultured in KSOM. *Biol. Reprod.* 61 : 225—230.

Dobranski I. 2005. Germ cell transplantation and testis tissue xenografting in domestic animals. *Anim. Reprod. Sci.* 89 : 137—145.

Frankenhuis M. T., Kramer M. F., de Rooij D. G. 1982. Spermatogenesis in the boar. *Veterinary Quarterly.* 4 : 57—61.

Gang B., Yanfeng L., Qiansheng L., Fengshuo J., Yong Z. 2005. Isolation and purification of human spermatogenous cells. *Acta Acad. Med. Militaris Tertiae.* 27 : 1142—1144.

Goel S., Fujihara M., Minami N., Yamada M., Imai H. 2008. Expression of NANOG, but not POU5F1, points to the stem cell potential of primitive germ cells in neonatal pig testis. *Reproduction.* 135 : 785—795.

Goel S., Sugimoto M., Minami N., Yamada M., Kume S., Imai H. 2007. Identification, isolation, and in vitro culture of porcine gonocytes. *Biol. Reprod.* 77 : 127—137.

Han S. Y., Gupta M. K., Uhm S. J., Lee H. T. 2009. Isolation and in vitro culture of pig spermatogonial stem cell. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22 : 187—193.

Heidari B., Gifani M., Shirazi A., Zarnani A. H., Baradaran B., Naderi M. M., Behzadi B., Borjian-Boroujeni S., Sarvari A., Lakpour N., Akhondi M. M. 2014. Enrichment of undifferentiation type A spermatogonia from goat testis using discontinuous Percoll density gradient an differential plating. *Avicenta J. Med. Biotech.* 6 : 94—103.

Izadyar F., Spierenberg G. T., Creemers L. B., den Ouden K., de Rooij D. G. 2002. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reprod.* 124 : 85—94.

Kanatsu-Shinohara M., Muneto T., Lee J., Takenaka M., Chuma S., Nakatsuji N., Horiuchi T., Shinohara T. 2008. Long-term culture of male germline stem cells from hamster testes. *Biol. Reprod.* 78 : 611—617.

Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K., Miki H., Ogura A., Toyokuni S., Shinohara T. 2003. Long-term proliferation in culture and germline transmission of mouse male germline stem cells. *Biol. Reprod.* 69 : 612—616.

Kuijk E. W., Colenbrander B., Bernard R. A. J. 2009. The effects of growth factors on in vitro-cultured porcine testicular cells. *Reprod.* 138 : 721—731.

Lee D. R., Kaproth M. T., Parks J. E. 2001. In vitro production of haploid germ cells from fresh or frozen-thawed testicular cells of neonatal bulls. *Biol. Reprod.* 65 : 873—878.

Lee W. Y., Lee K. H., Heo Y. T., Kim N. H., Kim J. H., Kim J. H., Moon S. H., Chung H. J., Yoon M. J., Song H. 2014. Transcriptional coactivator undifferentiated embryonic cell transcription factor 1 expressed in spermatogonial stem cells: a putative marker of boar spermatogonia. *Anim. Reprod. Sci.* 30 : 115—124.

Livak K. J., Schmittgen T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25 : 402—408.

Luo J., Megee S., Rathi R., Dobranski I. 2006. Protein gene product 9.5 is a spermatogonia-specific marker in the pig testis: application to enrichment and culture of porcine spermatogonia. *Mol. Reprod. Dev.* 73 : 1531—1540.

Marret C., Durand Ph. 2000. Culture of porcine spermatogonia: effects of purification of the germ cells, extracellular matrix and fetal calf serum on their survival and multiplication. *Reprod. Nutr. Develop.* 40 : 305—319.

Nagano M., Ryu B. Y., Brinster C. J., Avarbock M. R., Brinster R. L. 2003. Maintenance of mouse male germ line stem cells in vitro. *Biol. Reprod.* 68 : 2207—2214.

Oatley J. M., Avarbock M. R., Brinster R. L. 2007. Glial cell line-derived neurotrophic factor regulation of genes essential for self-renewal of mouse spermatogonial stem cells is dependent on Src family kinase signaling. *J. Biol. Chem.* 282 : 25 842—25 851.

Rivarola M. A., Sanchez P., Saez J. M. 1986. Inhibition of RNA and DNA synthesis in Sertoli cells by co-culture with spermatogenic cells. *Int. J. Androl.* 9 : 424—434.

Rodriguez-Sosa J. R., Dobson H., Hahnel A. 2006. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep. *Theriogenol.* 66 : 2091—2103.

Ryu B. Y., Kubota H., Avarbock M. R. 2005. Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *PNAS.* 102 : 14 302—14 307.

Sofikitis N., Pappas E., Kawatani A., Baltogiannis D., Loutradis D., Kanakas N., Giannakis D., Dimitriadis F., Tsoukanelis K., Georgiou I., Makrydimas G., Mio Y., Tarlatzis V., Melekos M., Miyagawa I. 2005. Efforts to create an artificial testis: culture systems of male germ cells under biochemical conditions resembling the seminiferous tubular biochemical environment. *Hum. Reprod. Update.* 11 : 229—259.

Sousa M., Cremades N., Alves C., Silva J., Barros A. 2002. Developmental potential of human spermatogenic cells cocultured with Sertoli cells. *Hum. Reprod.* 17 : 161—172.

Takagi Y., Talbot N. C., Rexroad C. E. 1997. Identification of pig primordial germ cells by immunocytochemistry and lectin binding. *Mol. Reprod. Develop.* 46 : 567—580.

Tesarik J., Mendoza C., Anniballo R., Greco E. 2000. In vitro differentiation of germ cells from frozen testicular biopsyspecimens. *Hum. Reprod.* 15 : 1713—1716.

CO-CULTURE OF BOAR SPERMATOGONIAL CELLS WITH SERTOLI CELLS

I. P. Savchenkova,¹ S. A. Vasil'eva

Ya. R. Kovalenko's All-Russian State Research Institute of Experimental Veterinary, Moscow, 109428;

¹ e-mail: s-ip@mail.ru

In the present study, we developed *in vitro* culture conditions using co-culture of boar spermatogonial cells with Sertoli cells. Testes from 60-day-old crossbred boar were used. A spermatogonia-enriched culture was achieved by enzymatic digestion method and purification by density gradient centrifugation using a discontinuous Percoll gradient and differentiated adherence technique. Lipid drops were detected in isolated Sertoli cells by Oil Red O staining. We have found that the cultivation of boar spermatogonia in the presence of Sertoli cells (up to 35 days) leads to their differentiation as well as *in vivo* in testis. Association of cells in groups, formation of chains and suspension clusters of the spermatogenic cells were observed on the 10th day. Spermatogonial cellular colonies were noted at the same time. These cellular colonies were analyzed for the expression of genes: *Nanog* and *Plzf* in RT PCR. The expression of the *Nanog* gene in the experimental cellular clones obtained by short-term culture of spermatogonial cells in the presence of Sertoli cells was 200 times higher than the expression of this gene in the freshly isolated spermatogonial cells expression was found in freshly isolated germ cells and in cellular clones derived *in vitro*. We have found that, in the case of longer cultivation of these cells on Sertoli cells, *in vitro* process of differentiation of germ cells and formation of single mobile boar spermatozoa occurs at 30—33 days. Cellular population is heterogeneous at this stage. Spermatogenic differentiation *in vitro* without Sertoli cells stays on the 7th day of cultivation. The results show that co-culture of boar spermatogonia-enriched cells with Sertoli cells can induce their differentiation into spermatozoa *in vitro* and facilitate obtaining of porcine germ cell culture.

Key words: boar testes, spermatogonial cells, Sertoli cells, co-culture, differentiation, gene expression.
