

ПРОЛИФЕРАТИВНАЯ АКТИВНОСТЬ КЛЕТОК СЕРТОЛИ ИЗВИТЫХ СЕМЕННЫХ КАНАЛЬЦЕВ МЫШИ В КУЛЬТУРЕ

© *Е. А. Малолина*^{1,2} *А. Ю. Кулибин*^{1,*}

¹ *Институт биологии развития им. Н. К. Кольцова РАН, Москва, 119334, и*

² *Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н. Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, 123098;*

** электронный адрес: Kulibin.a.bkrj@gmail.com*

Для выяснения вопроса о возможности активной пролиферации клеток Сертоли (КС) извитых канальцев мыши в культуре были применены различные методики культивирования КС. Установлено, что только единичные КС извитых канальцев способны к ограниченной пролиферации при их сокультивировании с активно пролиферирующими КС транзитной зоны, при добавлении в культуральную среду ростовых факторов LIF, IGF-1, активина А и комплекса низкомолекулярных ингибиторов (Y-27632, A-83-01 и CHIR99021), а также при использовании более щадящего метода выделения КС в культуру в составе фрагментов семенных канальцев. Ни в одном из случаев колоний КС не формируется. Значительное увеличение пролиферации КС извитых канальцев (до $9.8 \pm 1.0\%$) получено только при искусственном ингибировании, с помощью РНК-интерференции, экспрессии Dmrt1, ключевого транскрипционного фактора, управляющего процессом дифференцировки КС.

Ключевые слова: клетки Сертоли, пролиферативная активность, терминально дифференцированные клетки, Dmrt1, РНК интерференция.

Принятые сокращения: КС — клетки Сертоли, ПМК — перитубулярно-мышечные клетки, ПЦР — полимеразная цепная реакция, FBS — фетальная бычья сыворотка, IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста 1, LIF — лейкемия-ингибирующий фактор, siРНК — малая интерферирующая РНК (small interfering RNA), YAC — низкомолекулярные ингибиторы Y-27632, A-83-01 и CHIR99021.

Долгое время КС половозрелых млекопитающих считались наряду с нейронами и кардиомиоцитами примером терминально дифференцированных клеток, вышедших из клеточного цикла. Но исследования последней пары десятилетий заставили пересмотреть это представление (Tarulli et al., 2012). Было установлено, что КС лабораторных грызунов и человека способны пролиферировать в культуре (Ahmed et al., 2009; Nicholls et al., 2012; Кулибин, Малолина, 2013). Кроме того, в ряде исследований (Zhang et al., 2004, 2006; Guo et al., 2007) была показана частичная дедифференцировка КС в ответ на повышение температуры *in vivo* и *in vitro*, проявляющаяся в разборке гематотестикулярного барьера и появлении маркера недифференцированных клеток кератина 18.

Во всех упомянутых ранее работах, авторы которых исследовали КС в культуре, анализировали все КС семенника вместе, без разделения на субпопуляции. Однако нами было установлено (Kulibin, Malolina, 2016), что популяция КС неоднородна. В культуре к активной пролиферации способна лишь небольшая субпопуляция КС, расположенная в транзитной зоне семенника на границе извитых семенных канальцев и сети семенника, системы сообщающихся полостей и каналов, по которой сперматозоиды транспортируются из семенных канальцев в выносящие канальцы и далее в придаток семенника эпидидимис. Напротив, среди субпопуляции КС извитых се-

менных канальцев только единичные клетки пролиферируют *in vitro*, причем они способны совершить только 1—2 клеточных деления в начале культивирования.

Для того чтобы прояснить вопрос о возможности активной пролиферации КС извитых канальцев в условиях культуры, в настоящей работе были применены различные методики культивирования КС, призванные усилить их пролиферативный потенциал. Таким образом, целью работы стала оценка способности КС извитых канальцев к пролиферации при их культивировании в различных условиях. В задачи исследования входила оценка пролиферативной активности КС извитых канальцев: 1) при их сокультивировании с клетками транзитной зоны семенника, 2) при культивировании в средах различного состава с добавлением ростовых факторов и комплекса низкомолекулярных ингибиторов, 3) при выделении в культуру в составе фрагментов канальцев и 4) при искусственном снижении уровня экспрессии Dmrt1, ключевого транскрипционного фактора, управляющего процессом дифференцировки КС.

Материал и методика

В работе использовали самцов мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2—3 мес, а также самцов мышей линии C57Bl/6-Tg(Actb-EGFP)1OsB/J того же возраста, экс-

Праймеры, использованные для ПЦР в реальном времени

Ген	Последовательности праймеров	
	Forward	Reverse
<i>Wt1</i>	GCT CCA GCT CAG TGA AAT GGA CAG AA	GGC CAC TCC AGA TAC ACG CCG
<i>Dmrt1</i>	GGT TGT AAC CAA GTT TTC AGG A	CCG CTC TTC TCA CTG GTC A
<i>Gdnf</i>	GGG TGC GTT TTA ACT GCC ATA	GCC CAA ACC CAA GTC AGT GA
<i>Sox9</i>	AGT ACC CGC ATC TGC ACA AC	ACG AAG GGT CTC TTC TCG CT

прессурирующих GFP под промотором гена бета-актина. Мышей содержали в стандартных условиях вивария с режимом день—ночь 12—12 ч, воду и корм животные получали ad libitum. Все эксперименты с животными проводили в соответствии с нормами, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях» и в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» Комиссии по биоэтике Института биологии развития РАН.

Для получения культуры КС извитых канальцев и КС транзитной зоны семенники под контролем бинокуляра разделяли на область извитых семенных канальцев и область, содержащую транзитную зону и сеть семенника. Далее все манипуляции с этими областями проводили отдельно. Одноклеточную суспензию, содержащую КС, получали с помощью энзиматической обработки ткани семенника коллагеназой IV типа (3 мг/мл; Sigma, США), ДНКазой I типа (0.1 мг/мл; Sigma) и трипсином (0.125 %; Thermo Fisher, США) и последующего пипетирования с помощью автоматического дозатора по методике, описанной нами ранее (Kulibin, Malolina, 2016). В случае выделения клеток в виде фрагментов канальцев по 50—100 клеток фрагменты канальцев получали, интенсивно встряхивая пробирку по окончании энзиматической обработки. Контролировали размер фрагментов под микроскопом и при необходимости повторяли процедуру встряхивания. Клетки культивировали в культуральных планшетах, покрытых Матригелем (Corning, США), при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. В качестве культуральной среды использовали DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher) с добавлением 1 % фетальной бычьей сыворотки FBS (HyClone, США) или 1 % AlbuMAX I Lipid-Rich BSA (Thermo Fisher), также в состав среды входили пируват натрия (110 мкг/мл; ПанЭко, Россия), инсулин—трансферрин—селенит (1, 0.55 и 0.67 мкг/мл; ПанЭко) и пенициллин—стрептомицин (50, 50 мкг/мл; ПанЭко). Когда указано, в среду добавляли рекомбинантные LIF (1 нг/мл; SCI Store, Россия) и инсулиноподобный фактор роста 1 IGF-1 (10 нг/мл; SCI Store), низкомолекулярные ингибиторы Y-27632 (10 мкМ; Abcam, Великобритания), A-83-01 (0.5 мкМ; Sigma) и CHIR99021 (3 мкМ; Sigma), а также активин А (50 нг/мл; R&D Systems, США). Среду меняли каждые 2-е сут.

Ингибирование экспрессии *Dmrt1* проводили на 3-и сут культивирования с помощью методики РНК-интерференции, используя siRNA Reagent System (Santa Cruz Biotechnology, США; sc-45064) и *Dmrt1* малую интерферирующую РНК (small interfering RNA; siРНК) (Santa Cruz Biotechnology; sc-143060), по протоколу фирмы-производителя.

Для иммунофлуоресцентной окраски культур КС на 6—10 сут культивирования использовали первичные антитела против *Wt1* (Santa Cruz Biotechnology; sc-192,

1 : 100), *Dmrt1* (Santa Cruz Biotechnology; sc-377167, 1 : 50) и GFP (Thermo Fisher; A10262, 1 : 400) и соответствующие вторичные антитела с флуоресцентной меткой (Thermo Fisher; A11008, A11037, A11005 и A11039, 1 : 500). Ядра докрашивали DAPI (Sigma). Окраску проводили по методике, описанной нами ранее (Kulibin, Malolina, 2016). Для оценки пролиферативной активности КС использовали Click-iT EdU Alexa Fluor 555 Imaging Kit (Thermo Fisher), в основе которого лежит мечение клеток в S-фазе клеточного цикла аналогом тимидина EdU, по методике фирмы-производителя. EdU добавляли в среду к культуре за 18 ч до фиксации. Препараты фотографировали на микроскопе Leica DM16000 (Германия), анализировали и проводили подсчеты с помощью программного обеспечения CellProfiler.

РНК из образцов культур выделяли с помощью RNeasy Mini Kit (Qiagen, США) по протоколу фирмы-производителя. Из РНК получали кДНК при помощи MMLV RT kit (Евроген, Россия). ПЦР в реальном времени проводили на StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США), используя SYBR green qPCRmix-HS with ROX (Евроген) и праймеры (Евроген) (см. таблицу). Для вычисления значений ΔC_t использовали средний уровень C_t для *Wt1*, стабильно экспрессирующегося маркера КС. Относительное количество РНК (relative quantification of RNA, RQ) вычисляли по методу $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, Schmittgen, 2001).

Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз. Все количественные данные представляли в виде: среднее \pm стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводили, используя непараметрический критерий Манна—Уитни.

Используемые реактивы: коллагеназа IV типа, ДНКазы I типа, ингибиторы A-83-01 и CHIR99021, DAPI (Sigma, США); трипсин, DMEM/F12 с GlutaMAX, AlbuMAX, первичные антитела против GFP, вторичные антитела, Click-iT EdU Alexa Fluor 555 Imaging Kit (Thermo Fisher, США); Матригель (Corning, США); FBS (HyClone, США); пируват натрия, инсулин—трансферрин—селенит и пенициллин—стрептомицин (ПанЭко, Россия); LIF и IGF-1 (SCI Store, Россия); ингибитор Y-27632 (Abcam, Великобритания); активин А (R&D Systems, США); siRNA Reagent System, *Dmrt1* малая интерферирующая РНК, первичные антитела против *Wt1*, *Dmrt1* (Santa Cruz Biotechnology, США); RNeasy Mini Kit (Qiagen, США); MMLV RT kit, SYBR green qPCRmix-HS with ROX, праймеры (Евроген, Россия).

Результаты и обсуждение

Сначала было проверено, способны ли КС транзитной зоны, активно пролиферирующие в культуре (Kulibin, Malolina, 2016), стимулировать пролиферацию КС

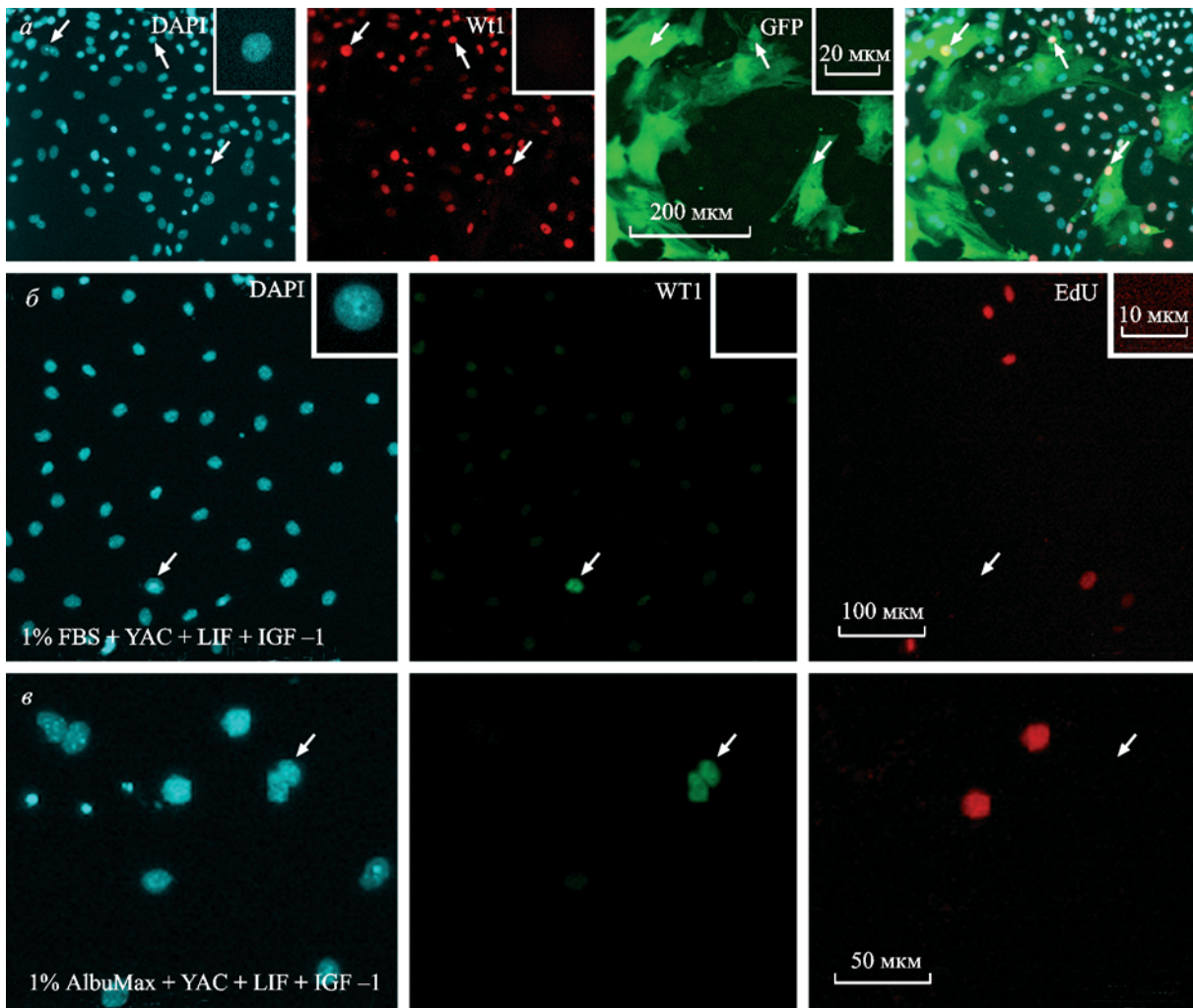


Рис. 1. Выявление Wt1 и GFP в сокультуре GFP⁺ КС извитых канальцев с КС транзитной зоны (а) и Wt1 и EdU в культурах КС извитых канальцев, поддерживающихся на средах различного состава (б, в).

Ядра клеток докрашены DAPI. Вставки (а, б) — отрицательный контроль без первичных антител. Стрелки — КС извитых канальцев.

извитых канальцев за счет паракринных или контактных взаимодействий при совместном культивировании. Для этого сокультивировали КС транзитной зоны, полученные от мышей линии C57Bl/6, и КС извитых канальцев GFP мышей. КС идентифицировали по экспрессии их маркера — транскрипционного фактора Wt1. В сокультуре КС транзитной зоны представляли собой мелкие клетки GFP⁻/Wt1⁺, формирующие колонии (рис. 1, а), GFP⁺/Wt1⁺ КС извитых канальцев (рис. 1, а, стрелки) часто располагались в непосредственной близости от колоний КС транзитной зоны, но поодиночке, не формируя GFP-положительных колоний. Остальные клетки GFP⁺ представляли собой перитубулярно-мышечные клетки (ПМК) стенки семенных канальцев.

Далее было изучено, способно ли обогащение культуральной среды повысить пролиферативный потенциал КС извитых канальцев. Для этого использовали два варианта среды, основу первого составлял 1 % FBS, основу второго — 1 % AlbuMAX, обогащенный липидами бычий сывороточный альбумин, добавляющийся в качестве заменителя сыворотки во многие бессывороточные среды. В оба варианта среды были добавлены ростовые факторы LIF и IGF-1, которые входят в состав сред для культивирования стволовых и прогениторных клеток, а также три

низкомолекулярных ингибитора — Y-27632 (ингибитор Rho-киназы), A-83-01 (ингибитор рецептора TGFβ 1-го типа) и SHIR99021 (ингибитор гликогенсинтазы киназы 3) (YAC), присутствие которых в среде позволяет стабильно культивировать различные виды стволовых и прогениторных клеток, а также способствует переходу дифференцированных клеток взрослого организма в недифференцированное состояние и их пролиферации (Katsuda et al., 2017). Однако в случае КС ни один из вариантов среды не привел к повышению пролиферации, КС (клетки Wt1⁺) были малочисленны и не включали EdU метку, т. е. находились вне клеточного цикла (рис. 1, б, в, стрелки), в культуре активно делились только ПМК.

Пролиферативная активность КС извитых канальцев была также оценена при менее травматичном, чем стандартный, способе выделения КС: КС сажали на культуральные планшеты не в виде одноклеточной суспензии, а в виде не полностью распавшихся фрагментов семенных канальцев. При этом способе выделения клетки в меньшей степени подвергались механическому воздействию и сохраняли большую жизнеспособность. Число КС в такой культуре, полученное на основе подсчета клеток, положительно окрашивающихся на Wt1, составляло $55.4 \pm 3.7\%$ на 6-е сут культивирования (рис. 3, а), одна-

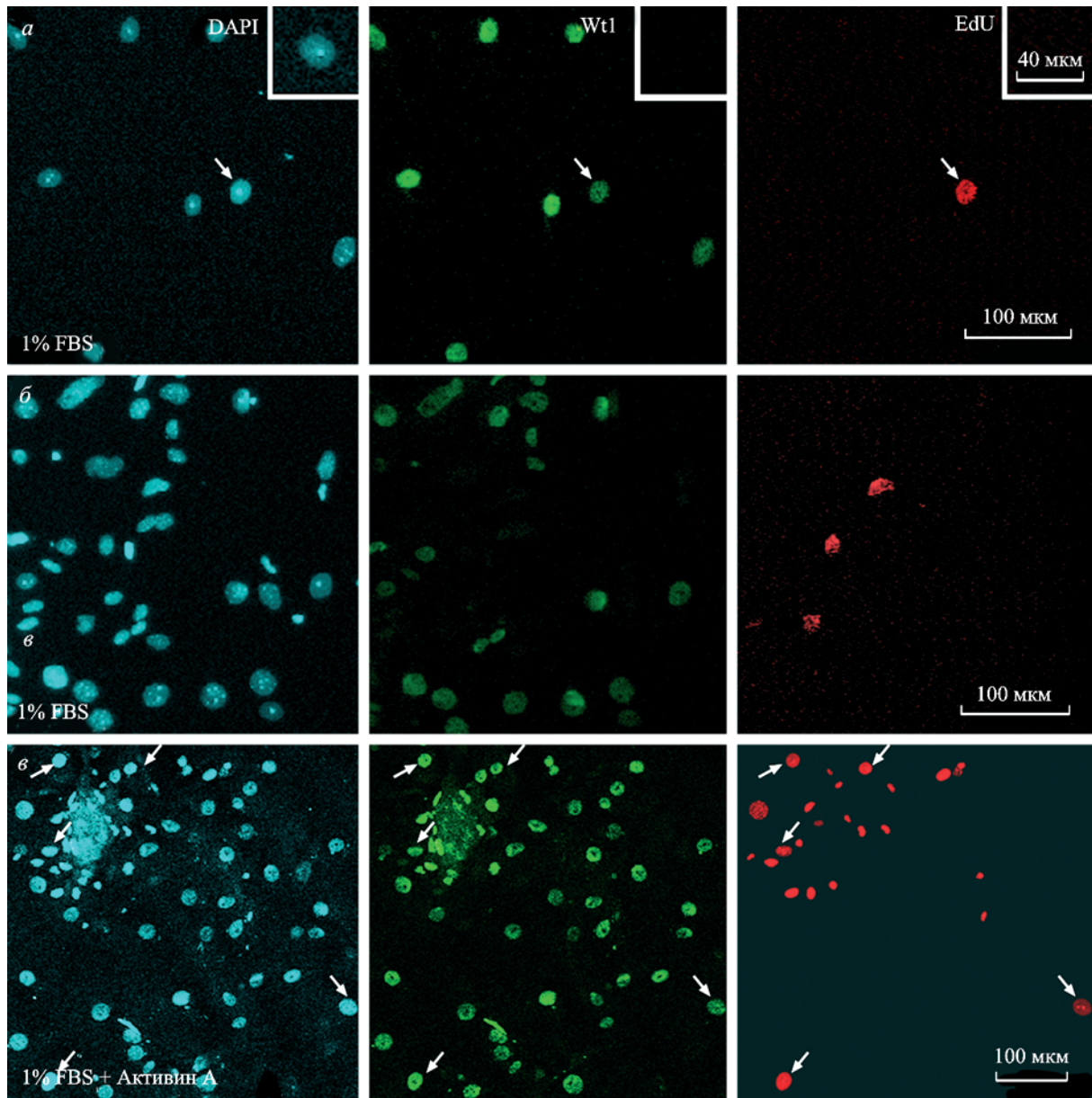


Рис. 2. Выявление Wt1 и EdU в КС извитых канальцев, выделенных в культуру в виде фрагментов канальцев.

Клетки культивировали без (а, б) или в присутствии (в) активина А. Ядра клеток докрашены DAPI. Вставки (а) — отрицательный контроль без первичных антител. Стрелки — КС извитых канальцев, включившие EdU.

ко только 2.4 ± 0.5 % КС включали EdU-метку, т. е. пролиферировали (рис. 2, а, стрелка; 3, а), остальные пролиферирующие клетки представляли собой ПМК (рис. 2, б; 3, б). При этом КС, «расползающиеся» из фрагментов семенных канальцев, располагались поблизости друг от друга (рис. 2, а, б), но не формировали колоний, что могло бы свидетельствовать об их активной и продолжительной пролиферации.

Активин А — ростовой фактор, регулирующий пролиферацию недифференцированных КС *in vivo* на паракринном уровне (Archambeault, Yao, 2010). Было установлено, что в культуре дифференцированные КС начинают пролиферировать активнее при добавлении активина А (Nicholls et al., 2012). Нами было проверено действие этого фактора на субпопуляцию КС извитых канальцев в сочетании со щадящей методикой их выделения в культуру,

описанной выше, т. е. с выделением КС в виде фрагментов семенных канальцев. В такой культуре часть КС действительно вступала в клеточный цикл (рис. 2, в, стрелки), однако увеличение пролиферативной активности КС (3.4 ± 0.6 % КС, включивших EdU-метку) было статистически незначимым (рис. 3, а). Напротив, ПМК в ответ на действие активина А начинали пролиферировать активнее: число ПМК, включивших EdU-метку, увеличилось с 27.6 ± 4.6 до 48.1 ± 5.2 % (рис. 3, б). Таким образом, по нашим данным, активин А не оказывает существенного влияния на пролиферацию КС извитых канальцев в культуре. Расхождение с работой, установившей положительный эффект активина А на деления КС (Nicholls et al., 2012), могут быть связаны с особенностями проведения эксперимента: в процитированной работе использовали крыс, а не мышей, причем возраст животных

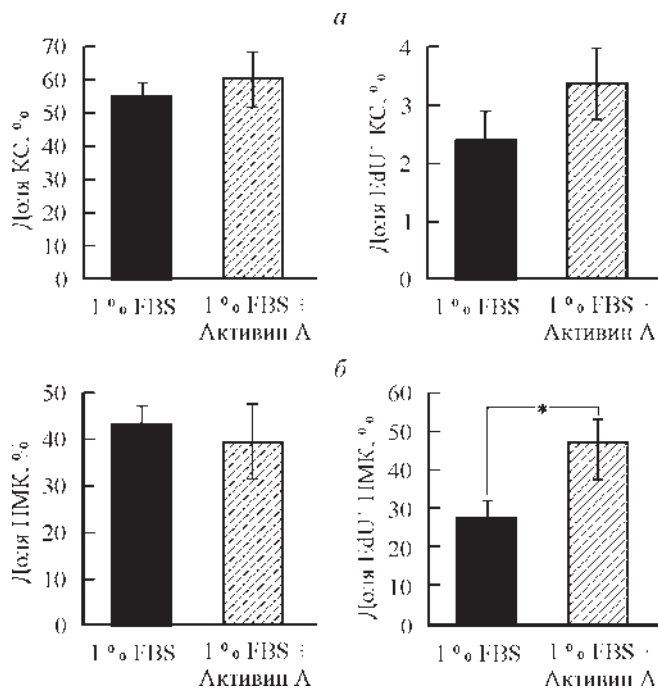


Рис. 3. Результаты количественного анализа клеточных культур фрагментов канальцев, культивирующихся без или в присутствии активина А.

Для KC (а) и ПМК (б) подсчитаны число клеток и число клеток, включивших EdU, относительно общего числа KC (а) или ПМК (б). Звездочка — различия достоверны при $p \leq 0.05$.

составлял 20 сут, т. е. это были неполовозрелые животные, у которых KC всего несколько суток назад прекратили пролиферацию и вступили в дифференцированное состояние и, возможно, с большей вероятностью могли вернуться к делениям. Кроме того, различия в результатах эксперимента могут быть связаны с тем, что в цитируемой работе (Nicholls et al., 2012) использовали KC, полученные из всего семенника, т. е. KC извитых канальцев и KC транзиторной зоны вместе, а последние активно пролиферируют в культуре.

Dmrt1 — один из ключевых факторов, ответственных за определение пола у животных разных систематических групп (Zarkower, 2013). У млекопитающих *Dmrt1*, который экспрессируется и в KC, и в сперматогониях, связан как с поддержанием пола гонады у взрослых организмов (Matson et al., 2011), так и с дифференцировкой KC в постнатальном развитии (Raymond et al., 2000). Ранее мы установили, что одна из отличительных черт KC транзиторной зоны, активно пролиферирующих в культуре, — отсутствие или слабая экспрессия транскрипционного фактора *Dmrt1* (Kulibin, Malolina, 2016). Для того чтобы определить, связан ли уровень экспрессии *Dmrt1* с пролиферацией KC извитых канальцев, были проведены эксперименты по искусственному снижению уровня экспрессии *Dmrt1* методом РНК-интерференции в культуре KC извитых канальцев. KC выделяли в культуру в виде фрагментов семенных канальцев.

По данным ПЦР в реальном времени, уровень экспрессии *Dmrt1* в культуре KC извитых канальцев на 3-и сут после ее трансфекции *Dmrt1* siРНК был в 2 раза ниже, чем в обеих контрольных культурах KC, т. е. в культуре, которая не подвергалась трансфекции, и в культуре, которая была трансфицирована контрольной siРНК (рис. 4, а). Кроме того, в культуре, трансфицированной

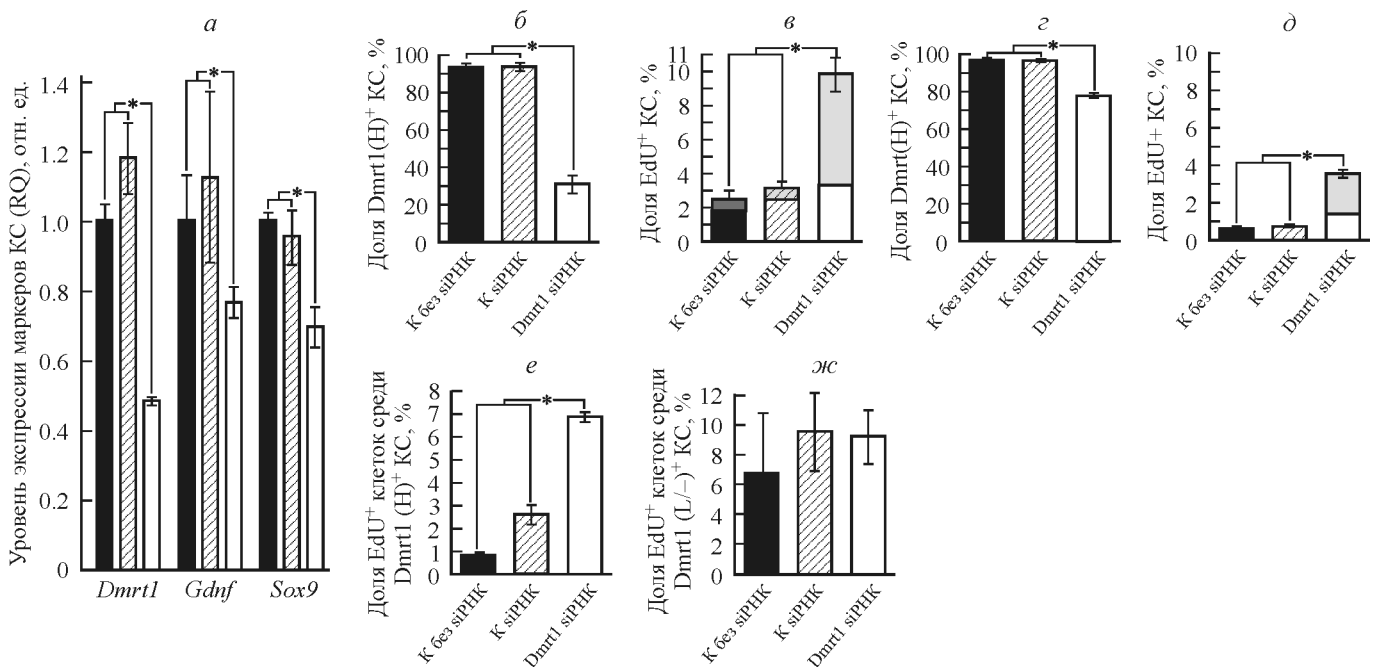


Рис. 4. Результаты РНК-интерференции *Dmrt1* в культуре KC извитых канальцев.

Представлены данные ПЦР в реальном времени образцов культуры через 3 сут после трансфекции (а) и количественного иммунофлуоресцентного анализа числа *Dmrt1*(H)⁺ KC (б, з) и числа EdU⁺ KC (в, д, е, ж) через 3 (б, в, е, ж) и 6 (з, д) сут после трансфекции. б–д — число флуоресцентно меченных клеток относительно общего числа KC в культуре; е, ж — число EdU⁺ KC в популяциях *Dmrt1*(H) — е и *Dmrt1*(L/-) KC — ж. К без siРНК — нетрансфицированная культура, K siРНК и *Dmrt1* siРНК — культуры, трансфицированные контрольной siРНК и *Dmrt1* siРНК соответственно. Заштрихованные области (в, д) — доля *Dmrt1*(L/-) KC. Звездочка — различия достоверны при $p \leq 0.05$.

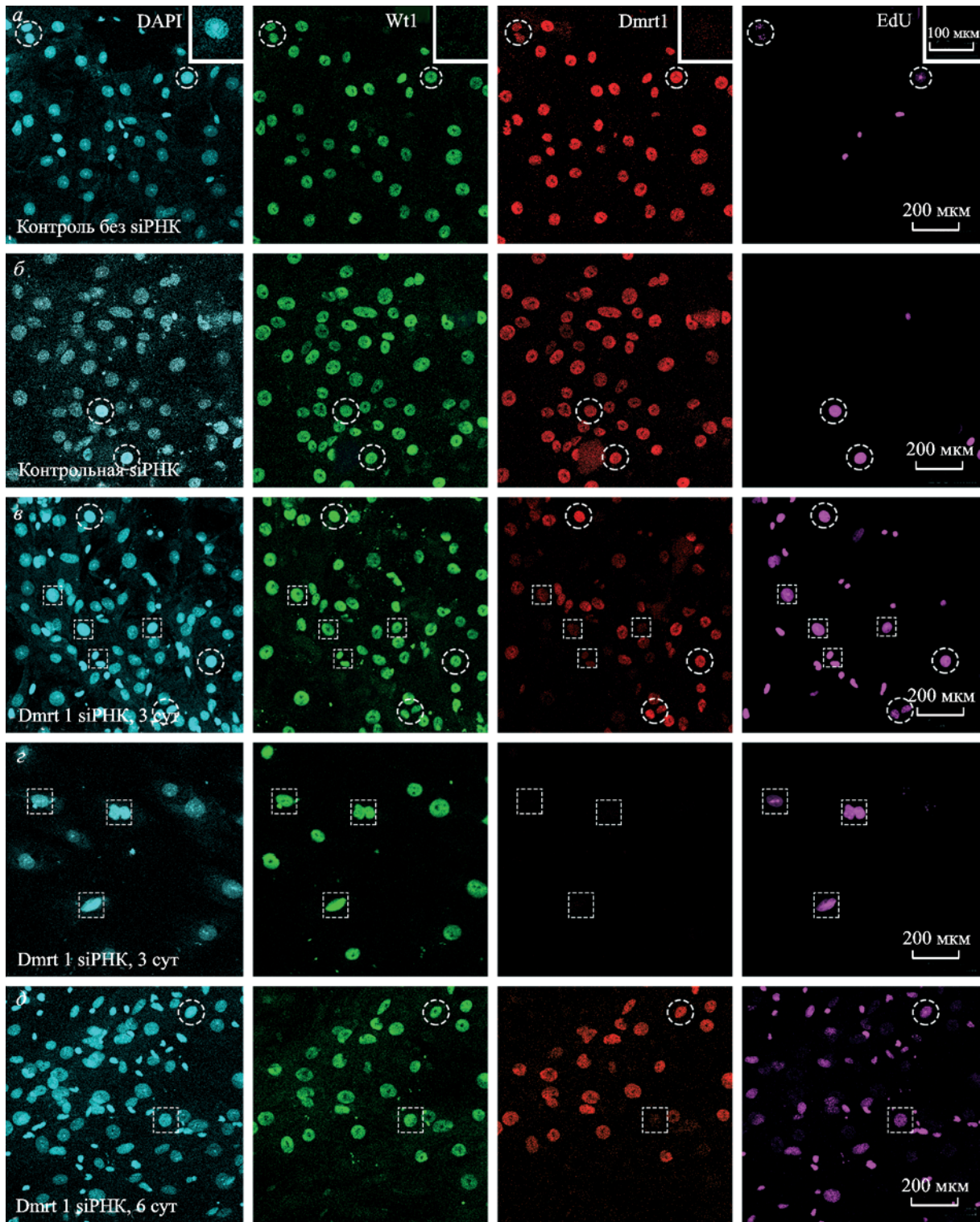


Рис. 5. Иммунофлуоресцентное выявление Wt1, Dmrt1 и EdU в культурах КС извитых канальцев в эксперименте по РНК-интерференции *Dmrt1*.

Ядра клеток докрасены DAPI. *а* — нетрансфицированная культура; *б* — культура, трансфицированная контрольной siРНК; *в–д* — культуры, трансфицированные *Dmrt1* siРНК через 3 (*в, з*) и 6 (*д*) сут после трансфекции. Штриховые квадраты — EdU⁺/Dmrt1(L⁻) КС, круги — EdU⁺/Dmrt1(H⁺) КС.

Dmrt1 siРНК, было снижено количество РНК *Gdnf* и *Sox9* (рис. 4, *а*), генов-маркеров КС.

По данным иммунофлуоресцентного анализа, примерно 95 % КС в контрольных культурах экспрессировали *Dmrt1* на высоком (high) уровне (Dmrt1(H⁺)) (рис. 4, *б*),

при этом пролиферативная активность КС не отличалась от подсчитанной ранее для данного способа выделения КС и составляла соответственно для двух контрольных культур 2.2 ± 0.5 и 3.0 ± 0.5 % (рис. 4, *в*). На рис. 5, *а, б* представлены репрезентативные фото этих культур,

штриховыми кругами отмечены включившие EdU-метку Dmrt1(H)⁺ КС. В культуре, трансфицированной Dmrt1 siРНК, число Dmrt1(H)⁺ КС было резко снижено (рис. 5, в) и составляло всего $31.6 \pm 3.8\%$ (рис. 4, б), при этом число пролиферирующих КС, напротив, увеличилось до $9.8 \pm 1.0\%$ (рис. 4, в). Необходимо отметить, что большая часть пролиферирующих КС не экспрессировала Dmrt1 или экспрессировала его на слабом уровне (low) (Dmrt1(L/-)) (рис. 4, в, заштрихованная часть столбика; рис. 5, в, з, штриховыми квадратами отмечены КС EdU⁺/Dmrt1(L) — в и EdU⁺/Dmrt1(-) — з, кругами — EdU⁺/Dmrt1(H)⁺ КС). На 6-е сут после трансфекции число Dmrt1(H)⁺ КС вновь возрастало, хотя и не достигало уровня контрольных значений (рис. 4, з; 5, д), а число пролиферирующих КС падало, но все еще было выше контрольного уровня (рис. 4, д; 5, д).

Также было подсчитано число пролиферирующих КС отдельно среди Dmrt1(H)⁺ и Dmrt1(L/-) КС на 3-и сут после трансфекции. Оказалось, что среди Dmrt1(H)⁺ КС доля клеток, включающих EdU-метку, увеличилась после трансфекции более чем в 2 раза (рис. 4, е), в то же время Dmrt1(L/-) КС включали EdU-метку на одном уровне как в контроле, так и после трансфекции (рис. 4, ж). Полученные данные свидетельствуют о том, что КС извитых канальцев со сниженным уровнем Dmrt1 обладают более высокой пролиферативной активностью, но в норме число таких клеток невелико; искусственное увеличение числа Dmrt1(L/-) КС с помощью РНК-интерференции позволяет повысить общий уровень пролиферации КС. Увеличение пролиферации Dmrt1(H)⁺ КС после трансфекции, скорее всего, связано с некоторой произвольностью выделения категорий Dmrt1(H)⁺ и Dmrt1(L/-) КС на основе иммунофлуоресцентной окраски: Dmrt1(H)⁺ КС в культуре после трансфекции, бесспорно содержащие большее количество Dmrt1, чем Dmrt1(L/-) КС, могут содержать меньшее количество Dmrt1, чем Dmrt1(H)⁺ КС в контрольных культурах, однако такие небольшие различия в интенсивности окраски сложно заметить без дополнительных измерений.

Таким образом, КС извитых канальцев половозрелых мышей не переходят к активной пролиферации в культуре ни в случае их совместного культивирования с КС транзитной зоны семенника, ни при добавлении к культуре различных факторов, в том числе вызывающих дедифференцировку зрелых клеток в других органах, ни при смене условий выделения КС в культуру. По нашим данным, единственным способом значительного повышения числа пролиферирующих КС извитых канальцев мыши является искусственное подавление в них экспрессии Dmrt1, т. е. их приближение к характеристикам КС транзитной зоны. Существуют еще исследования, в результате которых удалось добиться значительной пролиферации зрелых КС извитых канальцев (Chaudhary et al., 2005; Sridharan et al., 2007), при этом все они были основаны на использовании различных методик генетической модификации. Исключение составляют работы на животных с сезонными изменениями репродуктивной активности, демонстрирующие активную пролиферацию КС в ответ на изменения гормонального фона (Tarulli et al., 2006, 2012). Возможно, создание подобных колебаний уровня тех или иных гормонов искусственно может привести к значительному повышению пролиферативной активности КС таких животных и человека. Однако в одном уже проведенном исследовании (Tarulli et al., 2013) были выявлены деления лишь единичных КС в ответ на гормо-

нальные стимулы, т. е. имела место ситуация, близкая к полученной нами в культуре КС.

Исходя из всего вышеперечисленного можно заключить, что КС извитых канальцев половозрелых животных с сезонными изменениями репродуктивной активности, а также человека все-таки представляют собой стабильную клеточную популяцию, клетки которой, скорее всего, неспособны к активной пролиферации без искусственного вмешательства на генетическом уровне. В этой связи особый интерес представляет дальнейшее изучение популяции КС транзитной зоны, которые, по-видимому, представляют собой единственный источник способных к пролиферации КС в семенниках половозрелых организмов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 16-34-60119 мол_а_дк) и ФИМТ № 0108-2018-0012 с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н. К. Кольцова РАН.

Список литературы

- Кулибин А. Ю., Малоліна Е. А. 2013. Характеристика культуры клеток Сертоли в условиях повышенной температуры и гипоксии. Цитология. 55 (11) : 788—797. (Kulibin A. Y., Malolina E. A. 2013. Sertoli cells cultured under high-temperature and hypoxic conditions. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 8 : 97—106.)
- Ahmed E. A., Barten-van Rijbroek A. D., Kal H. B., Sadri-Ardekani H., Mizrak S. C., van Pelt A. M., de Rooij D. G. 2009. Proliferative activity *in vitro* and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells. Biol. Reprod. 80 : 1084—1091.
- Archambeault D. R., Yao H. H. 2010. Activin A, a product of fetal Leydig cells, is a unique paracrine regulator of Sertoli cell proliferation and fetal testis cord expansion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 107 : 10 526—10 531.
- Chaudhary J., Sadler-Riggelman I., Ague J. M., Skinner M. K. 2005. The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce post-mitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate. Biol. Reprod. 72 : 1205—1217.
- Guo J., Tao S. X., Chen M., Shi Y. Q., Zhang Z. Q., Li Y. C., Zhang X. S., Hu Z. Y., Liu Y. X. 2007. Heat treatment induces liver receptor homolog-1 expression in monkey and rat Sertoli cells. Endocrinology. 148 : 1255—1265.
- Katsuda T., Kawamata M., Hagiwara K., Takahashi R. U., Yamamoto Y., Camargo F. D., Ochiya T. 2017. Conversion of terminally committed hepatocytes to culturable bipotent progenitor cells with regenerative capacity. Cell Stem Cell. 20 : 41—55.
- Kulibin A. Y., Malolіna E. A. 2016. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture. Reproduction. 152 : 271—281.
- 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. 4 : 402—408.
- Maison C. K., Murphy M. W., Sarver A. L., Griswold M. D., Bardwell V. J., Zarkower D. 2011. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis. Nature. 476 : 101—104.
- Nicholls P. K., Stanton P. G., Chen J. L., Olcorn J. S., Haverfield J. T., Qian H., Walton K. L., Gregorevic P., Harrison C. A. 2012. Activin signaling regulates Sertoli cell differentiation and function. Endocrinology. 153 : 6065—6077.
- Raymond C. S., Murphy M. W., O'Sullivan M. G., Bardwell V. J., Zarkower D. 2000. Dmrt1, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation. Genes Develop. 14 : 2587—2595.

Sridharan S., Simon L., Meling D. D., Cyr D. G., Gutstein D. E., Fishman G. I., Guillou F., Cooke P. S. 2007. Proliferation of adult Sertoli cells following conditional knockout of the Gap junctional protein GJA1 (connexin 43) in mice. *Biol. Reprod.* 76 : 804—812.

Tarulli G. A., Stanton P. G., Lerchl A., Meachem S. J. 2006. Adult Sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: effect of FSH on proliferation and junction protein organization. *Biol. Reprod.* 74 : 798—806.

Tarulli G. A., Stanton P. G., Loveland K. L., Rajpert-De Meyts E., McLachlan R. I., Meachem S. J. 2013. A survey of Sertoli cell differentiation in men after gonadotropin suppression and in testicular cancer. *Spermatogenesis.* 3 : e24014.

Tarulli G. A., Stanton P. G., Meachem S. J. 2012. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? *Biol. Reprod.* 87 : 1—11.

Zarkower D. 2013. DMRT genes in vertebrate gametogenesis. *Curr. Top. Develop. Biol.* 102 : 327—356.

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. *Int. J. Androl.* 27 : 234—239.

Поступила 17 XII 2017

PROLIFERATIVE ACTIVITY OF SERTOLI CELLS FROM MOUSE CONVOLUTED SEMINIFEROUS TUBULES

E. A. Malolina,^{1,2} A. Yu. Kulibin^{1,*}

¹ N. K. Koltzov Institute of Developmental Biology RAS, Moscow, 119334, and

² Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098;

* e-mail: kulibin.a.bkrj@gmail.com

To elucidate if Sertoli cells (SCs) from mouse convoluted seminiferous tubules can actively proliferate *in vitro*, several approaches to SC culturing were adopted. It was demonstrated that only occasional SCs from convoluted seminiferous tubules were capable to limited proliferation after 1) their co-culturing with highly proliferative SCs from the transitional zone of the testis, 2) treatment with growth factors LIF and IGF-1, activin A, and a combination of low-molecular-weight inhibitors (Y-27632, A-83-01, and CHIR99021), and 3) culturing in the form of small seminiferous tubule fragments. SC colonies were formed in none of the cases. The proliferative activity of SCs from seminiferous tubules was only significantly increased (to 9.8 ± 1.0 %) after reducing the expression of *Dmrt1*, the key transcription factor regulating SC differentiation, by RNA-interference.

Key words: Sertoli cells, proliferative activity, terminally differentiated cells, *Dmrt1*, RNA interference.