МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра эмбриологии

Мун Валерий Владимирович

Влияние комплекса низкомолекулярных веществ YAC на Сертоли-подобные клетки семенника мыши в культуре

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Научные руководители:
с.н.с., к.б.н. А.Ю. Кулибин,
н.с., к.б.н. Е.А. Малолина

Лаборатория эволюционной биологии развития ИБР РАН

Москва – 2020 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ СОКРАЩЕНИЙ 3

ВВЕДЕНИЕ 4

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 6

1. Сперматогенез 6
2. Фаза митотических делений 8
3. Мейоз 8
4. Спермиогенез 9
5. Клетки Сертоли 10
6. Морфология клеток Сертоли 11
7. Молекулярные исследования клеток Сертоли 13
8. Пролиферативная активность зрелых КС 16
9. Влияние ингибиторов сигнальных путей на СПК в культуре 18

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 20

1. Животные 20
2. Выделение и культивирование Сертоли-подобных клеток 20
3. Схема экспериментов 21
4. Иммунофлуоресцентная окраска культур СПК 22
5. Статистический анализ 23

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ 24

1. Исследование влияния комплекса низкомолекулярных ингибиторов (YAC) на прикрепление СПК в культуре 24
2. Исследование изменения чувствительности СПК к YAC, при его добавлении на разные сроки культивирования 27
3. Изучение влияния комплекса низкомолекулярных ингибиторов YAC на пролиферативную активность Dmrt1+ и Dmrt1- СПК в культуре 29

ВЫВОДЫ 35

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 36

СПИСОК ЧАСТО ВСТРЕЧАЮЩИХСЯ СОКРАЩЕНИЙ

КС – клетка Сертоли

ЛГ – лютеинизирующий гормон

ПМК – перитубулярно-мышечные клетки

РК – ретиноевая кислота

СПК – Сертоли-подобные клетки

ФСГ – фолликулостимулирующий гормон

ACTA2 - альфа-актинин 2

AR – андрогеновый рецептор

BSA – бычий сывороточный альбумин

Cdh1 – cadherin 1 (кадгерин 1)

Cyp26b – cytochrome P450 (цитохром P450 B)

Dmrt1 – doublesex and mab-3 related transcription factor 1 (фактор транскрипции, связующий Mab-3 и ген Doublesex)

EdU – 5-этинил-2'-дезоксиуридин

Foxl2 – forkhead box protein L2 (фактор транскрипции)

Gata1 – GATA binding protein 1 (эритроидный фактор транскрипции 1)

Gata4 – GATA binding protein 4 (эритроидный фактор транскрипции 4)

Nr5a1 – nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1 (ядерный рецептор 5a1)

Pax8 – paired-box gene 8 (фактор транскрипции)

Sf1 – steroidogenic factor 1

Sox9 – SRY (sex determining region Y)-box 9 (фактор транскрипции)

Tgf-β1 – transforming growth factor, beta 1 (трансформирующий фактор роста β1)

Trf – transferrin (трансферрин)

Wt1 – Wilms tumor 1 homolog (белок опухоли Вилмса, фактор транскрипции)

Y – Y-27632 ингибитор Rho-ассоциированнай киназы

A – A-83-01 ингибитор рецептора TGFbeta 1 типа

C – CHIR99021 ингибитор гликоген-синтазы-киназы 3

ВВЕДЕНИЕ

Сперматогенез – сложно организованный многоступенчатый процесс дифференцировки мужских половых клеток, непрерывность протекания и высокая продуктивность которого во многом зависит от деятельности поддерживающих клеток – клеток Сертоли (КС). КС располагаются в сперматогенном эпителии извитых семенных канальцев и находятся в непосредственном контакте с развивающимися половыми клетками. К их функциям относятся: формирование гемато-тестикулярного барьера, поддержание популяции сперматогониальных стволовых клеток, обеспечение развития дифференцирующихся половых клеток путем гормональной регуляции и питания (Franca *et al*., 2016). Обширность функций и ключевая роль КС в сперматогенезе приводят к их высокой степени дифференцировки и выходу из клеточного цикла после полового созревания. Обратной стороной медали является то, что при нарушении функционирования КС их популяция не возобновляется, а развитие половых клеток необратимо нарушается. В результате, многие патологические изменения яичек, приводящие к бесплодию, являются следствием либо неправильной дифференцировки КС, либо их повреждения или гибели (Hai *et al*., 2014). В этой связи, важное значение как для репродуктивной биологии, так и для медицины приобретают исследования Сертоли-подобных клеток (СПК). СПК были обнаружены при изучении культур КС, полученных из целого семенника мышей. Анализ таких культур показал, что в них присутствуют две популяции клеток: КС делящиеся 1-2 раза и активно пролиферирующие СПК, формирующие колонии. Последние имеют схожую с КС морфологию и экспрессирут многие гены-маркеры КС в том числе и *Dmrt1*, важный для дифференцировки и функционирования КС транскрипционного фактор, но его экспрессия в СПК намного ниже чем в КС (Kulibin, Malolina, 2016). Одним из направлений дальнейших исследований стало увеличение экспрессии *Dmrt1* в СПК. Известно, что различные низкомолекулярные вещества, регулирующие сигнальные пути в клетке,

способствуют индукции и поддержанию плюрипотентности стволовых клеток. Было показано, что определенная комбинация некоторых ингибиторов различных сигнальных путей (Y-27632, A-83-01, CHIR99021, сокращенно YAC) способствует культивированию дифференцированных клеток и, даже, их репрограммированию (Katsuda *et al*., 2017). Оказалось, что добавление YAC в культуру СПК увеличивает в ней уровень экспрессии *Dmrt1* и других важных для поддержания половых клеток генов как трансферрин, ингибин А, *Gdnf* (Malolina, Kulibin, 2019), но механизмы действия YAC на СПК остаются неизвестными.

Целью настоящего исследования является изучение влияния комплекса низкомолекулярных ингибиторов YAC на Сертоли-подобные клетки. Для реализации поставленной цели, решались следующие задачи:

1) Оценить, влияет ли YAC на преимущественное прикрепление *Dmrt1*+ или *Dmrt1*- СПК в культуре.

2) Изучить изменения чувствительности СПК к комплексу YAC, в зависимости от длительности предварительной культивации на YAC–среде.

3) Исследовать влияние YAC на пролиферацию Dmrt1+ и Dmrt- Сертоли-подобных клеток в культуре.

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сперматогенез

Сперматогенез сложный, многоступенчатый процесс результатом которого является образование зрелых мобильных гамет сперматозоидов из сперматогониальных стволовых клеток. У млекопитающих дифференцировка мужских половых клеток происходит в извитых семенных канальцах семенника, и в его регуляции задействованы несколько типов соматических клеток, множество паракринных факторов и сложный комплекс гормональной и генетической регуляции (Hess, Franca, 2008; Neto *et al.*, 2016). Извитые семенные канальцы выстланы сперматогенным эпителием (рис. 1), в котором присутствуют половые клетки на разных стадиях развития, при этом на базальной мембране канальца расположены наименее дифференцированные половые клетки – стволовые и дифференцирующиеся сперматогонии, затем ближе к просвету – мейоциты и, наконец, рядом с просветом наиболее дифференцированные половые клетки – сперматиды (Leblond, Clermont, 1952). Сперматогенный эпителий так же содержит популяцию высокоспециализированных соматических клеток, клеток Сертоли (рис. 1), которые пронизывают слои половых клеток и выполняют поддерживающую функцию (Franca *et al.,* 2016).

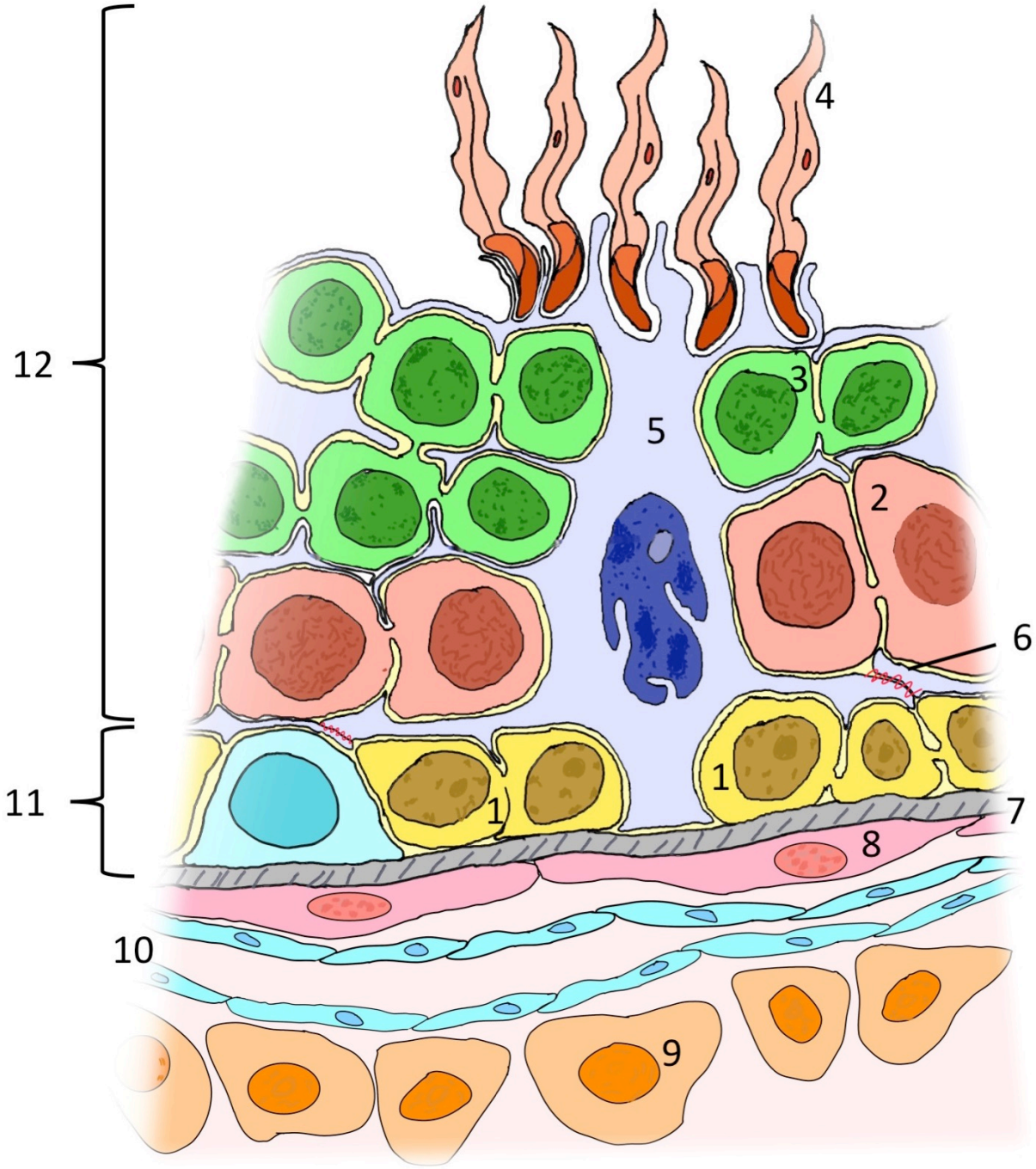

Рис. 1. Схема строения сперматогенного эпителия и интерстициальной ткани семенника мыши. 1 – сперматогоний, 2 – сперматоцит, 3 – округлая сперматида, 4 – удлиняющаяся сперматида, 5 – клетка Сертоли, 6 – зона плотных контактов между соседними клетками Сертоли, 7 – базальная мембрана, 8 – перитубулярно-мышечная клетка, 9 – клетка Лейдига, 10 – лимфатический сосуд, 11 – базальный компартмент, 12 – адлюминальный компартмент.

Сперматогенез можно разделить на 3 условных стадии: фаза митотических делений сперматогониев, мейоз и постмейотическая стадия развития – спермиогенез.

2. Фаза митотических делений.

В ходе данного этапа сперматогонии (диплоидные половые клетки) пролиферируют и самообновляются путем митотических делений. Необходимо сразу отметить, что характерной чертой сперматогенеза является деление с неполным цитокинезом в результате чего половые клетки, развиваются в синцитии где все потомки вступившей в дифференцировку стволовой клетки соединены между собой цитоплазматическими мостиками (фузомами). Развитие в синцитии необходимо для синхронизации митотических и мейотических делений половых клеток (Weber, Russell, 1987). Эта черта нашла свое отражение в классификации сперматогониальных клеток. Сперматогонии можно разделить на 3 группы по степени их дифференцировки: сперматогонии типа A, In (промежуточные) и B. У мышей и крыс сперматогонии типа A классифицируют более подробно. Выделяют недифференцированные сперматогонии, к которым относят одиночные сперматогонии (As), в том числе и сперматогониальные стволовые клетки, сперматогонии спаренные (Apr) и сперматогонии групповые (Aal). Групповые (Aal) сперматогонии без деления преобразуются в дифференцированные сперматогонии типа A1, которые у мышей делятся еще несколько раз, образуя сперматогонии A2, A3, A4, промежуточные сперматогонии (In) и, в конечном итоге, сперматогонии типа B (Russell *et al.,* 1993; Rooij, Russell, 2000).

3. Мейоз

Сперматогонии типа B делятся, с образованием двух сперматоцитов первого порядка, вступающих в стадию прелептотены профазы первого деления мейоза. На этой стадии клетки еще лежат на базальной мембране,

однако уже на стадии лептотены сперматоциты покидают базальную мембрану и перемещаются в сторону просвета (Russell, 1977; Russell, 1980). В профазе мейоза происходит последний в процессе развития мужских половых клеток этап удвоения ДНК, конденсация и синапсис гомологичных хромосом, а также процесс мейотической рекомбинации – кроссинговер. Необходимо отметить, что исследования на таких животных как: крыса, буйволы, бараны и свиньи, показали поразительное увеличение размера сперматоцитов 1 порядка в ходе развития от прелептотены до диплотены первого деления мейоза. Это, вероятно, связано с накоплением в это время большого количества транскриптов, которые будет необходимы для завершения последних стадий сперимогенеза. По окончании профазы клетка вступает в два последовательных мейотических деления. В результате первого деления мейоза (редукционного) тетраплоидный по количеству ДНК и диплоидный по количеству хромосом (4c2n) сперматоцит 1 порядка превращается в (2c1n) сперматоцит второго порядка, сразу вступающий во второе деление (эквационное) приводящее к образованию четырех гаплоидных округлых сперматид (1c1n) (Franca, Cardoso, 1998; Franca *et al.,* 2005).

4. Спермиогенез

Последний этап сперматогенеза – превращение округлых сперматид в зрелые сперматозоиды, которые распадаются на отдельные клетки, покидают сперматогенный эпителий и попадают в просвет семенного канальца. Процесс превращения сперматид в сперматозоиды называется спермиогенез, он приводит к значительным изменениям в их морфологии. Так аппарат Гольджи формирует акросомную везикулу, которая в дальнейшем созреет в акросому, хроматин ядра конденсируется, в следствии чего, ядро менят свою форму, становится более компактным, и покрывается акросомой, формируется жгутик и сбрасывается лишняя цитоплазма. В конечном итоге в просвет канальца

выходит зрелый сперматозоид, данный процесс называется спермиацией (Leblond, Clermont, 1952; Hess, Franca, 2008).

У мышей развитие мужских половых клеток происходит за 38-39 дней (Hess, Franca, 2008; Franca *et al.,* 2005). При этом, данный процесс имеет циклический характер, что находит отражение в морфологии эпителия семенных канальцев, в котором развивается сразу 4 генерации половых клеток закономерно сменяющих друг друга. Время, за которое сперматогенный эпителий претерпевает все циклические изменения и возвращается в исходное состояние (у мышей ~8,6 дня), называется циклом сперматогенного эпителия (Leblond, Clermont, 1952; Franca *et al.,* 2005). Более того, сперматогониальные стволовые клетки вступают в дифференцировку не хаотично, а последовательно по длине семенного канальца приводя к закономерной смене стадий цикла сперматогенного эпителия к т.н. «сперматогониальной волне». Пространственно-временная регуляция сперматогенеза сложна и плохо изучена, но несомненно то что главную роль в этом процессе играют поддерживающие клетки сперматогенеза – клетки Сертоли о которых речь пойдет ниже.

5. Клетки Сертоли

Семенные канальцы выстланы сперматогенным эпителием, в котором помимо половых клеток расположенных в виде концентрических слоев (Leblond, Clermont, 1952) присутствуют также высоко-специализированные соматические клетки, впервые обнаруженные Энрико Сертоли в 1865 году (Hess, Franca, 2005a) на срезах яичек человека, он же первым связал функции данных клеток со сперматогенезом (Setchell, 1993; Griswold, 1998). Позже, в 1888 году, Вон Эбнер (Von Ebner) назвал открытые клетки, клетками Сертоли (КС) (Ebner, 1888). Однако, исследования КС поначалу шли медленно, и, вплоть до 1950 года, было опубликовано около 25 статей. Но развитие электронной микроскопии и биохимии значительно ускорили темпы изучения

КС, и, на данный момент, об этих клетках публикуются сотни статей в год (Franca *et al.,* 2016).

6. Морфология клеток Сертоли

КС имеют продолговатую форму и большое число цитоплазматических отростков, поддерживающих и питающих развивающиеся половые клетки. (Burgos, Fawcett, 1955; Zebrun, Mollenhauer, 1960; Fawcett, 1975). Крупное, с большим количеством эухроматина, имеющее инвагинации мембраны и постоянно меняющееся в ходе цикла сперматогенного эпителия ядро КС является одной из самых узнаваемых структур в клетке (Hess, Franca, 2005b; Hess, Vogl, 2015). Так же ядро имеет большое, хорошо окрашивающееся ядрышко, которое является еще одним маркером клетки (Schulze *et al.,* 1976).

Тонкие цитоплазматические ветви, описанные еще Энрико Сертоли, оплетают половые клетки выростами, толщина коорых зачастую меньше 50 нм (Hess, Vogl, 2015). Данные отростки формируют чашеобразные структуры – карманы в которых находятся половые клетки на протяжении всей их дифференцировки. Лучше всего эта структура показана на трехмерной модели Лонни Рассела, созданной на основании серии электронных микрофотографий одиночной КС (Russell, 1993) (Рис. 2).

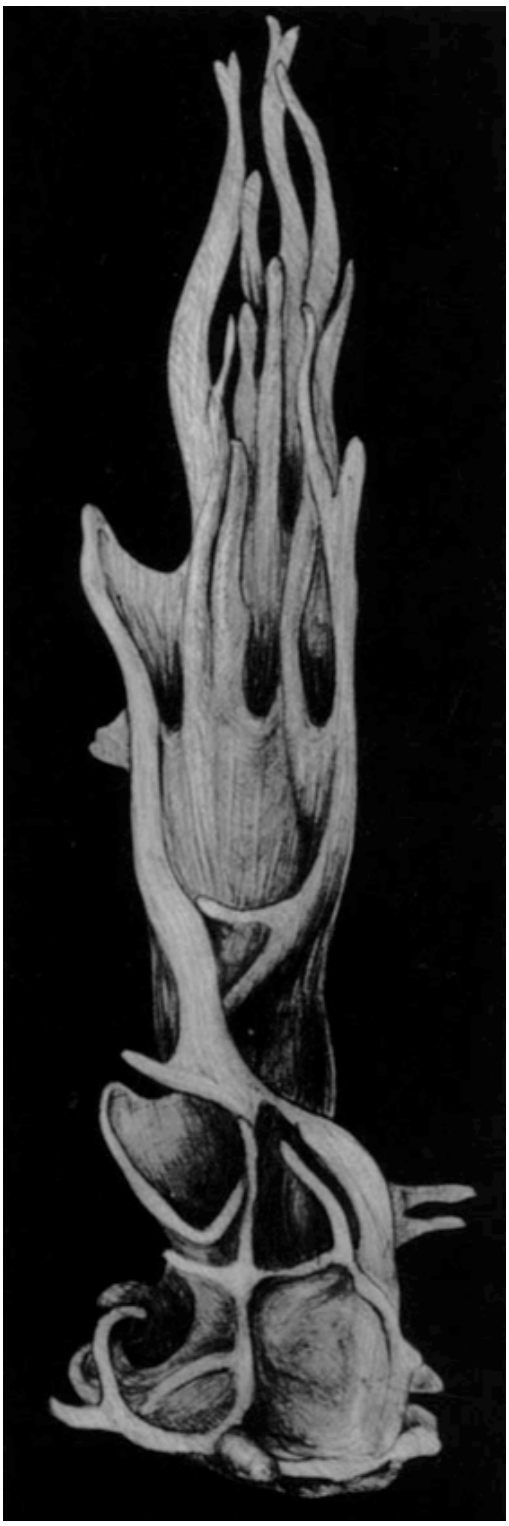

Рис. 2. Трехмерная модель клетки Сертоли (Russell, 1993)

Еще одной морфологической особенностью КС является образование непрерывной по длине канальца клеточной сети из связанных друг с другом плотными контактами клеток. Данные структуры основа гемато-тестикулярного барьера разделяющего каналец на два компартмента

базальный, обращенный к базальной мембране и адлюминальный, обращенный к просвету канальца. Этот барьер отделяет сперматогониальные клетки от мейотических половых клеток и сперматид. Такое разделение выполняет две важные функции: во-первых, создает иммунологически привилегированную область, вокруг мейотических клеток и сперматид (Dym, Cavicchia, 1977), во-вторых, за счет непроницаемости для большинства крупных регуляторных молекул, формирует уникальную среду необходимую для развития клеток в разных компартментах. Удивительным свойством сперматогенного эпителия в целом, и гемато-тестикулярного барьера в частности, является возможность перехода сперматоцитов на стадии лептотены из базального в адлюминальный компартмент, через плотные контакты между соседними КС. Однако, главная особенность в том, что перемещение сотен половых клеток, связанных цитоплазматическими мостиками, происходит без разрушения гемато-тестикулярного барьера, а на выходе сперматоциты все так же остаются связанными в синцитий (Smith, Braun, 2012). Исходя из морфологических особенностей КС можно увидеть 3 их важные функции: барьерная, поддерживающая и питающая.

7. Молекулярные исследования клеток Сертоли

Первоначальное представление о КС, как о вспомогательных клетках, было сформировано благодаря изучению их морфологии, однако до сих пор многие молекулярные особенности КС остаются в секрете (Franca *et al.,* 2016). Появление методик по выделения и поддержанию чистых культур КС в 1970-1980-х годах способствовало развитию молекулярных исследований в данной области (Dorrington, Armstrong, 1975; Steinberger, 1975; Franca *et al.,* 2016). Новые методики и доступность антител позволили выявить множество специфических для КС геных продуктов (Franca *et al.,* 2016).

Одними из первых в КС открыли белки, осуществляющие транспорт ионов металлов, такие как переносчик железа трансферин и меди - церулоплазмин (Franca *et al.,* 2016; Skinner, Griswold, 1980; Skinner, Griswold, 1983). Эти

данные поддерживали представление о КС, как о питающих клетках, обеспечивающих транспорт необходимых микроэлементов к половым клеткам через гемато-тестикулярный барьер (Sylvester, Griswold, 1994). КС синтезируют компоненты плотных контактов, десмосом, щелевых контактов и вносят вклад в образование базальной мембраны (Franca *et al.,* 2016). Так же КС могут синтезировать факторы, ингибирующие иммунные реакции (Doyle *et al.,* 2012). Однако, природа сперматогенеза требует от КС и их структурных компонентов пространственно-временной изменчивости в экспрессии многих генов (Franca *et al.,* 2016).

Помимо вышеперечисленных функций КС играют ключевую роль в регуляции сперматогенеза, являясь мишенями для фолликуло-стимулирующего гормона (ФСГ), вырабатываемого в аденогипофизе и тестостерона, синтезируемого клетками Лейдига в ответ на другой гормон гипофиза ЛГ (лютеинизирующий гормон). КС конвертируют эти эндокринные сигналы в паракринную регуляцию сперматогенеза (Griswold, 1993; Johnston *et al.,* 2001). Однако данный процесс гораздо сложнене, чем кажется. Так КС могут по-разному отвечать на сигнальные молекулы, в зависимости от степени развития семенника, стадии цикла сперматогенного эпителия и пространственного расположения в семеннике. Ярким примером этого является синтез и разрушение ретиноевой кислоты (РК) в КС, важного регулятора развития половых клеток в эмбриональный и постнатальный пубертатный периоды развития сперматогенной системы, а также в процессе, собственно, сперматогенеза. В эмбриональных семенниках КС высоко экспрессируют фермент, разрушающий РК - CYP26B, поступающую от мезонефроса, этот механизм регуляции ретиноидного сигнала участвует в направлении развития половых клеток на путь сперматогенеза, блокируя преждевременное вхождение в мейоз (Bowles *et al.,* 2006). В постнатальном развитии в семеннике мыши, момент перехода недифференцированной сперматогонии типа Aal в A1, последующие деления сперматогониев и вступление в мейоз также контролируется РК, которую в это время вырабатывают КС. Интересно то, что

распределение ретинола (предшественника РК) идет очагами, в результате чего мейотические деления клеток наступают в разное время в разных участках семенного канальца, и формируют волны сперматогенеза (Hogarth, Griswold, 2010; Snyder *et al.,* 2010). Подобные тонкости работы семенника требуют формирования сложной сети генетической регуляции.

На данный момент основные имуногистохимические маркеры КС включают в себя: андрогеновый рецептор (AR) (Sar *et al.,* 1990), SOX9 (Fröjdman, *et al.,* 2000), WT1 (Sharpe *et al.,* 2003; Wang *et al.,* 2013), GATA1 (Chen *et al.,* 2005), GATA4 (McClusky *et al.,* 2009) и DMRT1 (Kulibin, Malolina, 2016; Малолина, Кулибин, 2018). Однако, в подтверждение вышесказанному, экспрессия данных маркеров изменчива во времени (Hess, Vogl, 2015), к примеру, *Sox9* активно экспрессируется в эмбриональных КС, но после рождения экспрессия значительно падает (Fröjdman, *et al.,* 2000), *Ar*, напротив, демонстрирует повышенную экспрессию после наступления половой зрелости в зрелых КС, *Wt1* экспрессируется одинаково на протяжении всего онтогенеза (Sharpe *et al.,* 2003), так же как и *Gata4* (Kyrönlahti *et al.,* 2011). Интересно, что экспрессия *Gata4* не меняется и в зависимости от стадии цикла сперматогенного эпителия, тогда как экспрессия *Gata1* резко снижается, при появлении удлиняющихся сперматид, а после спермиации снова возрастает (Yomogida *et al.,* 1994; Kyrönlahti *et al.,* 2011). В 2011г было показано, что потеря экспрессии транскрипционного фактора *Dmrt1* в КС взрослых мышей и воздействие на них РК приводит к активации экспрессиии транскрипционного фактора *Foxl2*, маркера фолликулярных клеток, что приводит к перепрограммированию КС в клетки гранулезы. Это исследование показало, что экспрессия *Dmrt1* в клетках Сертоли крайне важна для их функционирования у взрослых организмов (Matson *et al.,* 2011).

Помимо поддержания сперматогенеза КС играют важную роль в период раннего развития зародыша, учавствуя в формировании таких типов клеток, как клетки Лейдига и перитубулярные-мышечные клетки, а также учавствуют в направлени дифференцировки половых клеток в сперматогонии. (Svingen,

Koopman, 2013). Таким образом, КС выполняют множество разных функций: учавствуют в формировании семенника, поддерживают и питают половые клетки в ходе сперматогенеза, фагоцитирут излишки цитоплазмы половых клеток, контролируют высвобождение зрелых сперматозоидов в просвет извитого канальца семенника и формируют гемато-тестикулярный барьер, что делает их важным объектом для изучения.

8. Пролиферативная активность зрелых КС

Высокая важность КС для поддержания непрерывного течения сперматогенеза обеспечивается высокой степенью их дифференцировки, из-за чего КС зрелых млекопитающих утрачивают свои пролиферативные способности. Принято считать, что размер популяции КС млекопитающих определяется пролиферативной активностью клеток предшественников во время внутриутробного и раннего постнатального развития и далее уже не увеличивается (Tarulli, *et al.,* 2012), за исключением некоторых видов с сезонным размножением (благородный олень, джунгарский хомячок), у которых наблюдаются сезонные изменения количества КС (Hochereau-de Reviers, Lincoln, 1978; Tarulli *et al.,* 2006). Однако, исследования последних десятилетий заставляют снова обратиться к вопросу о митотической активности дифференцированных КС млекопитающих (Tarulli, *et al.,* 2012). Так еще в ранних световых и электронно-микроскопических исследованиях семенников разных видов (Dym, 1974; Osman, 1978; Nykänen, 1979) было показано, что популяция КС взрослых млекопитающих не однородна и, что в терминальных сегментах семенных канальцев, прилежащих к сети семенника (системы сообщающихся полостей и каналов, по которой сперматозоиды транспортируются из семенных канальцев в выносящие канальцы и далее в придаток семенника эпидидимис), находятся так называемые модифицированные КС. Данные клетки имеют типичное для КС ядро, однако доля периферического гетерохроматина больше (Nykänen, 1979). Ранние исследования не показали пролиферативную активность данных клеток в

зрелом семеннике (Kulibin, Malolina, 2016). Однако КС, располагающиеся в транзиторных зонах (ТЗ КС) дольше сохраняют способность к пролиферации у крыс в пубертатном периоде развития (Figueiredo *et al.,* 2016) и способны пролиферировать во взрослом состоянии у сирийских хомяков in vivo (Aiyama *et al.,* 2015). Кроме этого было показано, что и КС извитых семенных канальцев, находясь в состоянии митотического покоя в семенниках, экспрессируют белки, регулирующие клеточный цикл, к примеру *Cdkn1b*, который останавливает клетки в G1-фазе (Beumer *et al.,* 1999; Ahmed *et al.,* 2009), синтезируют белки репарации ДНК и ингибитор дифференцировки ID2, обычно не экспрессирующийся у дифференцированных клеток (Ahmed *et al.,* 2009). Взятые вместе эти особенности сильно выделяют КС среди других терминально дифференцированных клеток (Ahmed *et al.,* 2009). В недавних исследованиях КС человека и лабораторных грызунов сообщалось об их способности к пролиферации в культуре (Ahmed *et al.,* 2009; Kulibin, Malolina, 2014). С появлением пролифферативной активности КС был зафиксирован, рост экспрессии *Id2* и снижение – *Cdkn1b* в культуре, из чего авторы сделали вывод, что в постпубертатном семеннике существует баланс между индукторами и ингибиторами клеточного цикла, который препятствует пролиферации КС *in vivo* (Ahmed *et al.,* 2009). Кроме того, в ряде исследований на крысах и обезьянах, была показана способность КС к частичной дедифференцировке в ответ на повышение температуры in vivo и in vitro, которая выражалась в нарушении гемато-тестикулярного барьера и увеличенной экспрессии кератина 18 - маркера недифференцированных КС (Zhang *et al.,* 2006; Guo *et al.,* 2007; Малолина, Кулибин, 2018). Важно, что все вышепредставленные исследования КС, проведенные в культуре проводились с клетками полученными из цельного семенника. Однако, в 2016 году нами было установленно, что в культуре, полученной из цельного семенника, существуют две популяции КС, с разной способностью к пролиферации. Первые – это КС извитых семенных канальцев (в культурах полученных только из извитых семенных канальцев присутствуют только они), данные клетки делятся 1-2

раза, после чего прекращают пролиферацию. Вторая популяция клеток, с высокой пролиферативной активностью, формирует колонии характерной эпителиальной формы. Мы установили, что эта популяция присутствует в культурах, полученных из участка семенника содержащего сеть семенника и транзиторные зоны семенных канальцев. Данные клетки окрашиваются на основные маркеры КС, такие как WT1, SOX9, NR5A1 (SF1), GATA1, TRF, DMRT1, однако, уровень экспрессии Dmrt1, был сильно снижен по сравнению с КС из извитых канальцев (Kulibin, Malolina, 2016). В последних исследованиях данные клетки получили название Сертоли-подобные клетки (СПК), так как локализуются в сети семенника и помимо маркеров КС экспрессируют и другие гены не свойственные для КС, например, *Pax8*, *Cdh1* (Malolina, Kulibin,2019). Показано, что СПК имеют характерную для незрелых КС структуру ядра, с большим количеством ярких DAPI-окрашенных участков гетерохроматина (Kulibin, Malolina, 2016).

Подробное изучение пролиферативной активности КС извитых семенных канальцев в культуре показало, что хотя данные клетки и способны входить в клеточный цикл, их пролиферативная активность кончается после 1-2 делений и не активируется без искусственного вмешательства на генетическом уровне, ингибирования экспрессии *Dmrt1*. Таким образом, вероятно, СПК являются единственным источником высокопролиферативных КС в культуре (Малолина, Кулибин, 2018).

9. Влияние ингибиторов сигнальных путей на СПК в культуре

Различные низкомолекулярные вещества, регулирующие сигнальные пути в клетке, могут способствовать индукции и поддержанию плюрипотентности стволовых клеток, что делает поиск эффективной комбинации таких веществ перспективной задачей (Hou *et al.,* 2013). Из-за высокой сложности сигнальных путей внутри клетки, подбор компонентов осуществляется в основном эмпирическим методом (Tsutsui *et al.,* 2011). Было установлено, что комбинации, в состав которых входят низкомлекулярные ингибиторы: Y-27632

(ингибитор Rho-киназы), A-83-01(ингибитор рецептора TGF-β 1 типа) и CHIR99021 (ингибитор киназы гликоген-синтазы 3), способствуют поддержанию плюрипотентности клеток (Kawamata, Ochiya, 2010; Tsutsui *et al.,* 2011). Исследования влияния низкомолекулярных веществ на дифференцированные клетки показали, на примере гепатоцитов, что совместное использование ингибиторов Y-27632, A-83-01, CHIR99021 (YAC) продлевает пролиферативную активность гепатоцитов в культуре и способствует их репрограммированию (Katsuda *et al.,* 2017, Zhang *et al.,* 2018). Наши исследования показали, что YAC также положительно влияет и на культуру СПК, увеличивая экспрессию *Dmrt1* и пролиферативную активность клеток (Кулибин, Малолина, 2018; Malolina, Kulibin, 2019). Кроме того, СПК, обработанные этим комплексом, в условиях 3D культуры поддерживают развитие гамет вплоть до поздних стадий мейоза (Кулибин, Малолина, 2018). Исследование механизмов действия YAC на СПК является основной целью данной работы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1. Животные

В работе использовали самцов мышей линии C57Bl/6, возрастом от 2-4 мес. Мышей содержали в стандартных условиях вивария со световым режимом 12 ч дня и 12 ч ночи, 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 для экспериментальных и других научных целей» и в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных» Комиссии по биоэтике ИБР РАН.

2. Выделение и культивирование Сертоли-подобных клеток

Выделение и высевание клеток в культуру проводили по методике описанной в статье (Kulibin, Malolina, 2016). Для выделения СПК зону семенника мыши, прилегающую к сосудистой ножке и содержащую сеть семенника, в растворе Хенкса (HBSS) отделяли от основной части семенника и отсепаровывали канальцы сети семенника от белковой оболочки. Полученные образцы промывали в HBSS, после чего подвергали последовательной инкубации в двух растворах: сначала в растворе коллагеназы IV (3 мг/мл, Sigma) и ДНКазы I (0,1 мг/мл, Sigma) в среде F12 (Thermo Fisher Sci), затем трипсина (0,125%, Thermo Fisher Sci) и ДНКазы I (0,1 мг/мл, Sigma) в той же среде. Оба инкубирования проводились на шейкере при 110 об/мин в термостате при 37°C, в течении 15 минут с последующей промывкой канальцев в HBSS. Центрифугированием (1 мин, 600 об/мин) отделяли канальцы сети семенника, содержащие необходимые клетки**,** от клеток интерстициальной ткани и большей части половых клеток. После, при помощи пипетирования канальцы разбивали на отдельные клетки и подсчитывали их число в камере Горяева. Суспензию клеток высевали на четырех-луночные плато, покрытые аналогом базальной мембраны Matrigel (Corning), в концентрации 200 тыс. клеток на 1 $см^2$. В качестве базовой среды для культивирования СПК

использовали DMEM/F12 с GlutaMAX (Thermo Fisher Sci), содержащую пируват натрия (Thermo Fisher Sci), инсулин/трансферрин/селенит (ITS, Thermo Fisher Sci), пенициллин/стрептомицин (Пан-Эко) и 1% фетальной бычьей сыворотки (FBS, Thermo Fisher Sci). На следующие сутки после посадки (день 1) культуры отмывались раствором HBSS от не прикрепившихся клеток, меняли среду, далее, смену среды проводили каждые 2 сут.

3. Схема экспериментов

Для изучения механизмов действия YAC на СПК были проведены четыре серии экспериментов, которые основывались на сравнении клеток, растущих на базовой среде (YAC–) с базовой средой, содержащей коктейль из низкомолекулярных ингибиторов (YAC+, Y – 10 μM (Y-27632, Abcam, Великобритания); A – 0,5 μM (A-83-01, Sigma, США) и C – 3 μM (CHIR99021, Sigma, США).

В первой серии экспериментов СПК высевали в лунки, содержащие либо YAC+ среду, либо YAC–. На следующий день (день 1) в половине лунок среды меняли на противоположные, а в другой половине оставляли без изменений. Таким образом получилось 4 варианта культивирования: контрольные лунки с неизменной YAC– средой, и 3 экспериментальные лунки с неизменной YAC+ средой или, с изменением среды (YAC– на YAC+ или YAC+ на YAC–). Результаты эксперимента оценивали на 9 сут культивирования, подсчитывая долю *Dmrt1* экспрессирующих СПК в культурах. *Dmrt1* – один из ключевых генов-маркеров КС, необходимый для их функционирования, повышение или снижение уровня его экспрессии служит хорошей оценкой состояния СПК в культуре.

Во второй серии клетки высевали и культивировали в течении суток либо на YAC+ либо YAC– среде, после чего фиксировали. В этих двух сериях экспериментов оценивали влияние YAC на прикрепление клеток в культуре.

В третьей серии экспериментов изучалось изменение чувствительности СПК к комплексу YAC, в зависимости от длительности предварительной культивации на YAC– среде. Суспензию клеток высевали в лунки с YAC– и YAC+ средой (день 0), затем, на вторые, третьи и четвертые сутки культивирования в части лунок с YAC– средой, среду меняли на YAC+. В качестве контроля использовали клетки, неизменно находившиеся на среде YAC+. Результаты эксперимента оценивали на 9 сут культивирования.

В четвертой серии мы оценивали влияние YAC на пролиферативную активность Dmrt1+/- СПК в культуре, для этого мы вновь высевали клетки на YAC+ и YAC– среды, но с добавлением в культуры аналога тимидина (EdU) на разные сроки культивирования. В половине культур EdU добавлялся на 2 сут, сроком на 18 часов, в другой половине – на 7 сут, с тем же сроком инкубации. По истечении срока инкубации с EdU культуры фиксировали.

4. Иммунофлуоресцентная окраска культур СПК

В конце каждого эксперимента колонии фиксировали 4% параформальдегидом в течении 10 минут. Далее клетки инкубировали в блокирующем буфере (3% BSA, 0.1% Tween 20, и 0.5% Triton X-100 на PBS) в течении 30 минут при 37°C. После обработки детергентами клетки последовательно инкубировались с первичными антителами против Wt1 (Santa Cruz Biotechnology, США, sc-192, 1:100) и Dmrt1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-377167, 1:50) и соответствующими вторичными антителами с флуоресцентной меткой (Thermo Fisher, A11008 и A31571, 1:500). Все антитела разводились в блокирующем буфере без Triton X-100 (3% BSA и 0.1% Tween 20 в PBS). В четвертой серии экспериментов, для определения пролиферативной активности клеток, в среду добавляли аналог тимидина EdU на 2 и 7 сутки культуры за 18 ч до фиксации. Метку выявляли с помощью набора Click-iTTM EdU AF 555 Kit (Thermo Fisher Sci) по инструкции фирмы-производителя, после окрашивания антителами. Ядра докрашивали DAPI. На микроскопе Leica DMI6000

(Германия) производили съемку 50-100 полей зрения в каждой лунке, подсчет клеток и анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения CellProfiler.

5. Статистический анализ

Каждый эксперимент повторяли не менее двух-трех раз. Все количественные данные представляли в виде: среднее ± стандартная ошибка среднего значения. Сравнение средних значений в контрольных и экспериментальной выборках проводили с использованием непараметрического критерия сравнения для независимых выборок (Манна-Уитни).

1. Исследование влияния комплекса низкомолекулярных ингибиторов (YAC) на прикрепление СПК в культуре

Результаты эксперимента были нормированы по контрольной YAC– культуре (вар. 1), доля DMRT1-положительных СПК в ней была принята за 100%. При смене YAC+ среды на YAC– на первые сут (вар. 2, YAC+/YAC– на Рис. 3), доля DMRT1-положительных клеток в культуре на 9 сут значимо не отличается от контроля и составляет 108,9 ± 21.7%. При смене среды с YAC– на YAC+ (вар. 3, YAC–/YAC+ на Рис. 3) на первые сут культуры и при культивировании на YAC+ среде (вар. 4), доли DMRT1-положительных клеток на 9 сут статистически достоверно увеличивались по сравнению с контролем в 3,2 ± 0,7 и 3,5 ± 0,6 раза соответственно (Рис. 3).

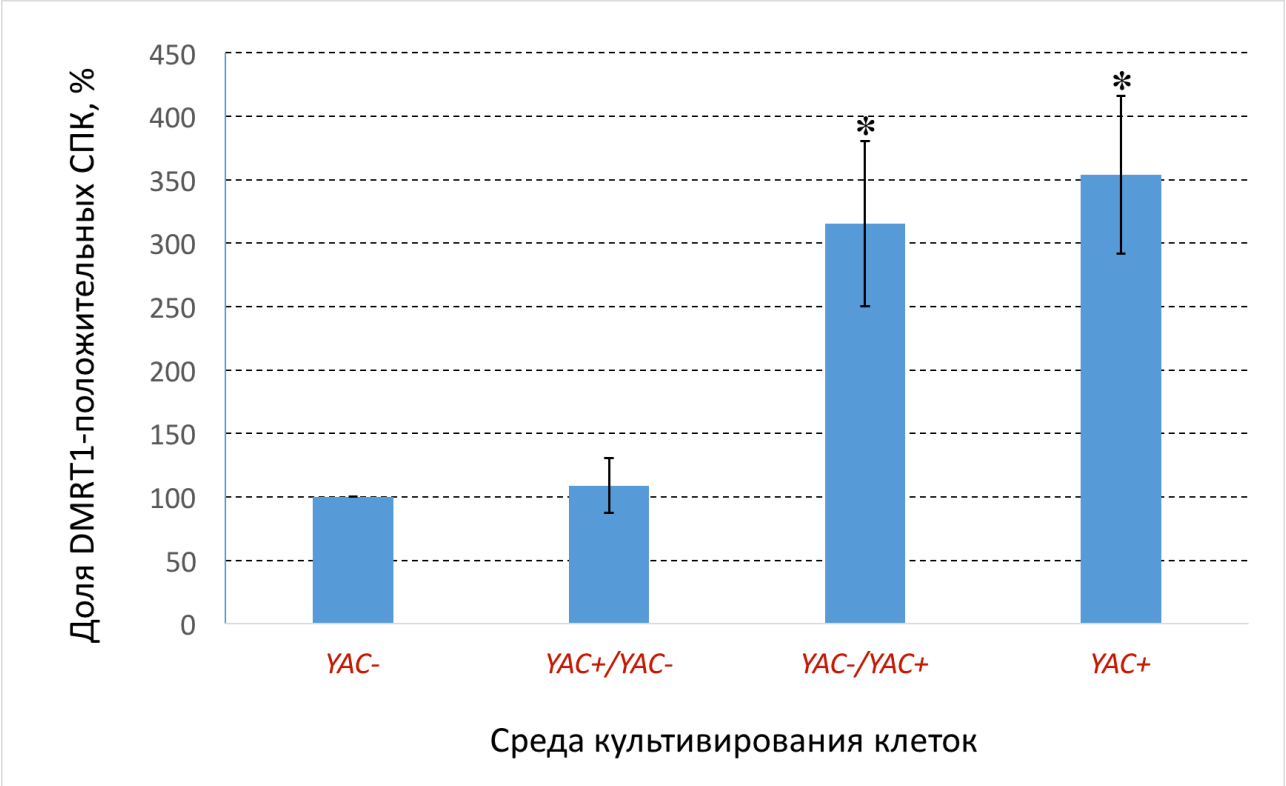

Рис. 3. Доля DMRT1+ СПК на 9 сут культивирования в различных средах. * - различия от контроля статистически достоверны при p≤0.05.

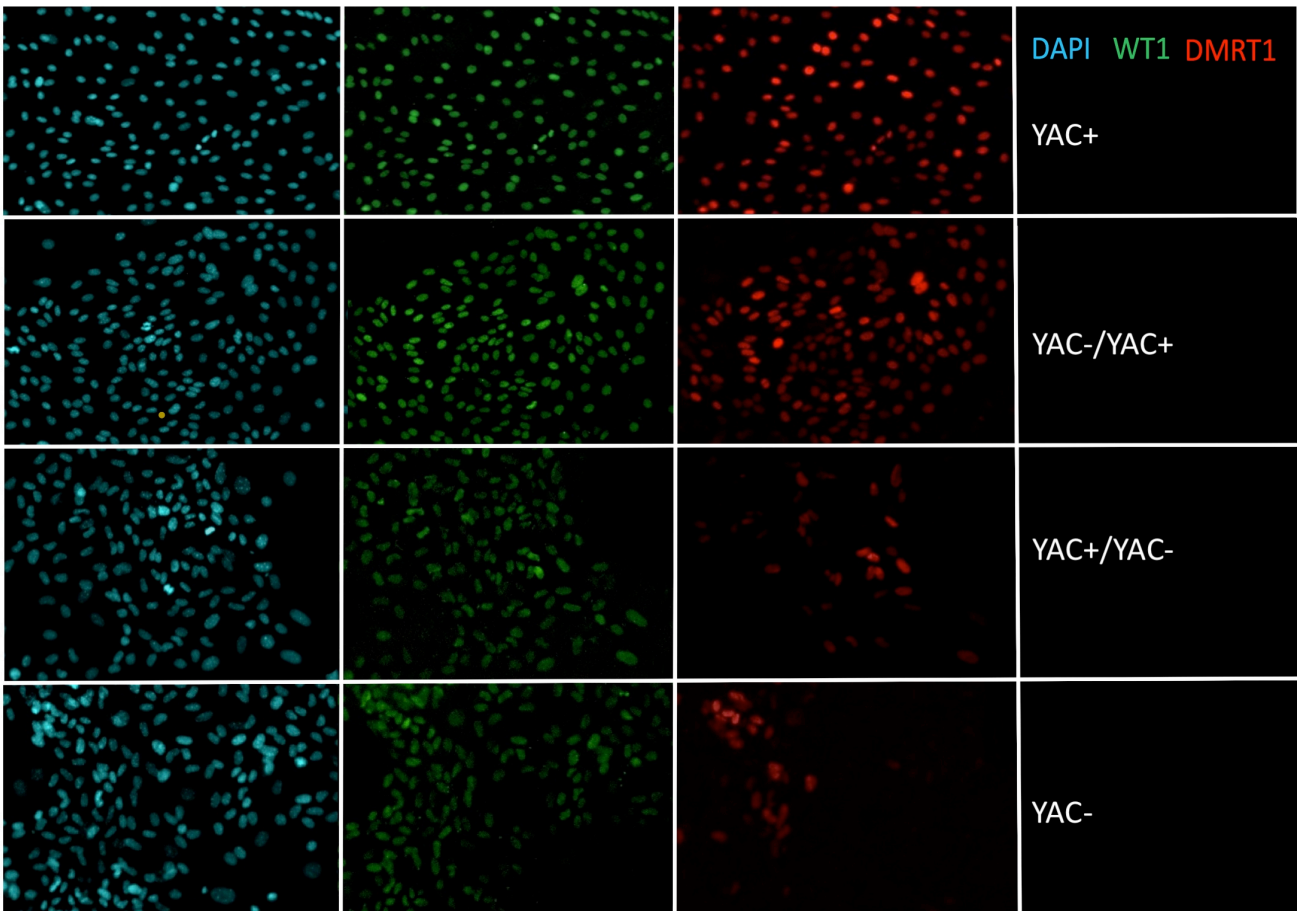

Рис. 4. Репрезентативные фотографии культур СПК на 9 сут. Окраска на маркеры КС WT1 и DMRT1, ядра окрашены DAPI.

На рис. 4 представлены репрезентативные фотографии колоний СПК на 9 сут культивирования в четырех различных вариантах среды, окрашенные на маркеры КС WT1 (присутствует во всех СПК) и DMRT1. Полученные в этом эксперименте результаты позволяют предположить, что комплекс ингибиторов YAC не оказывает заметного влияния на преимущественное прикрепление DMRT1-положительных СПК к матригелю по сравнению с клетками не экспрессирующими этот фактор. В противном случае следовало бы ожидать повышения доли DMRT1-положительных СПК во втором варианте культуры (YAC+/YAC–) по сравнению с контролем и, наоборот, снижение этого показателя в третьем варианте культуры YAC–/YAC+ по сравнению с последним вариантом. Тем не менее, необходимо отметить, что уже после сут культивирования на среде без YAC на 9 сут культуры наблюдается небольшое

снижение доли DMRT1-положительных СПК по сравнению с YAC+ средой, это может свидетельствовать о постепенном снижении чувствительности СПК к YAC при их культивировании на базовой среде.

Как видно из Рис. 5 доли DMRT1-положительных СПК в культурах, росших сутки на YAC+ или YAC– средах, статистически значимо не отличаются друг от друга и составляют 3,9 ± 0,7% и 4,8 ± 1,1% соответственно. На репрезентативных фотографиях представлены отдельные СПК и группы из нескольких клеток, окрашенных на WT1 (см. Рис. 6). Видно, что при обоих условиях культивирования на первые сутки только единичные WT1+-клетки окрашены на DMRT1. Результаты обоих экспериментов, взятые вместе, говорят о том, что добавление YAC к среде приводит к увеличению экспрессии *Dmrt1* в СПК в процессе их культивирования и не связано с особенностями прикрепления DMRT1+/– клеток.

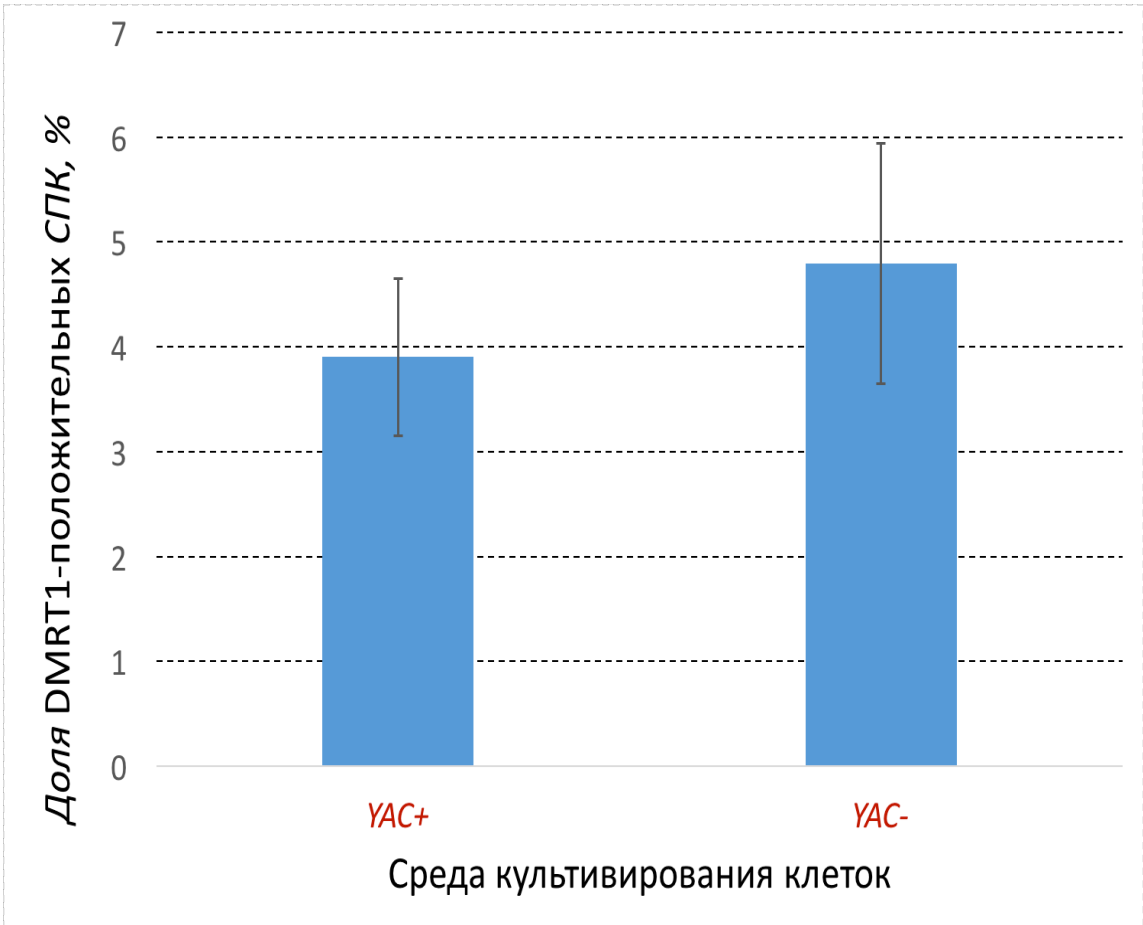

Рис. 5. Доля DMRT1+ СПК на 9 сут культивирования в различных средах.

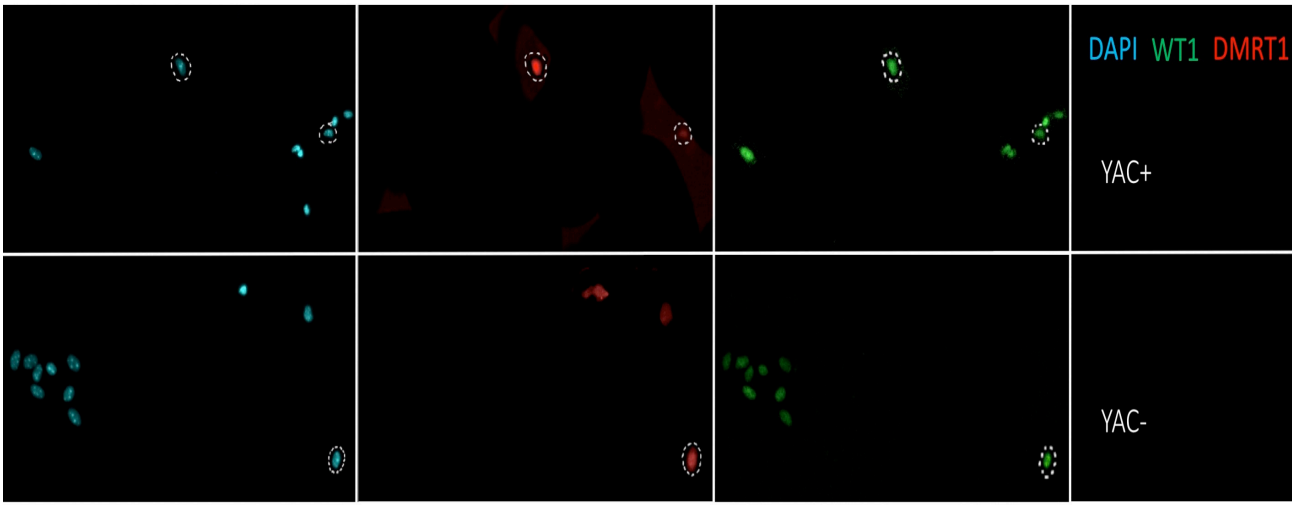

Рис 6. Репрезентативные фотографии YAC+ и YAC- культур на 1 сут. Пунктиром обозначены единичные DMRT1+ СПК. Окраска на маркеры КС WT1 и DMRT1, ядра окрашены DAPI.

2. **Исследование изменения чувствительности СПК к YAC, при его добавлении на разные сроки культивирования**

Результаты эксперимента были нормированы по контрольной YAC+ культуре, доля DMRT1-положительных СПК в ней была принята за 100%. К 9 сут доля DMRT1-положительных СПК в культурах, в которые YAC начали добавлять начиная со 2, 3 и 4-х сут культивирования, была снижена по сравнению с контролем до 43,0 ± 0,1, 34 ± 7,5 и 21 ± 3,4 % соответственно (Рис. 7). На Рис. 8 представлены репрезентативные фотографии колоний СПК на 9 сут культуры во всех четырех вариантах среды, окрашенные на маркеры КС WT1 и DMRT1. На изображениях видно, что доля DMRT1-положительных клеток постепенно снижается с увеличением срока культивирования без YAC, как плотность и размеры колоний. Полученные результаты согласуются с данными предыдущих исследований, так Катсуда и соавторы (Katsuda et al., 2017) показали, что гепатоциты мыши при культивировании на бессывороточной среде без добавления YAC (0,05% BSA) плохо пролиферируют и теряют свой фенотип. Похожие результаты были получены и при культивировании СПК в среде с 1% FBS, схожей с базовой средой,

используемой в этом исследовании (Kulibin, Malolina, 2016). В этих условиях в СПК, по сравнению с первыми сут культуры, на 9 сут наблюдалось значительное снижение экспрессии ряда генов-маркеров КС, таких как: Inha, Trf, Dhh, Gdnf, Fsh, KitL. Кроме этого, авторы отмечают потерю клетками эпителиального фенотипа и постепенное появление экспрессии *AktA2* (Актин А), гена-маркера клеток гладкой мускулатуры и др. стромальных клеток. Эти факты свидетельствуют о прохождении т.н. эпителио-мезенхимального перехода СПК в стромальные клетки при их культивировании в подобных условиях. Добавление YAC к среде культивирования предотвращает изменение фенотипа и экспрессию *AktA2* (Malolina, Kulibin, 2019). Вероятно, постепенная потеря фенотипа в бедной сывороткой среде без YAC приводит к тому, что клетки после определенного момента уже не могут начать экспрессировать *Dmrt1* при добавлении YAC.

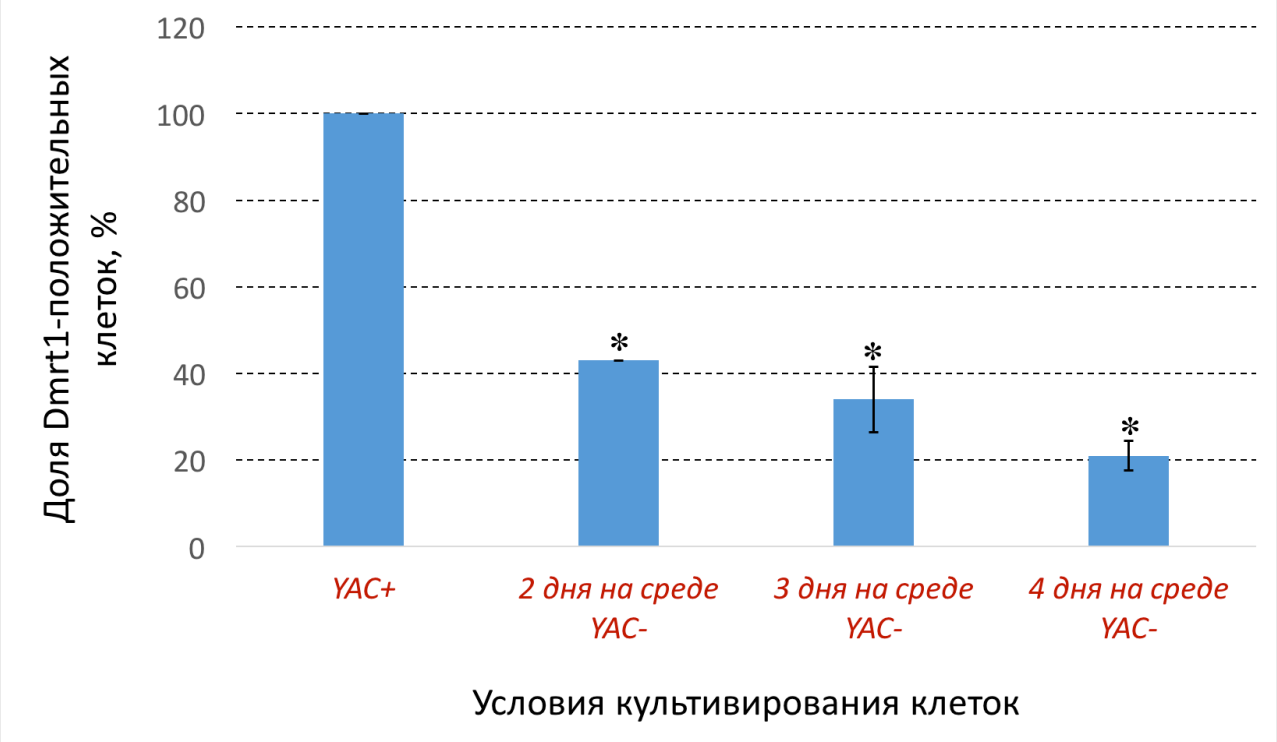

Рис. 7. График изменения доли DMRT1+ СПК на 9 сут культивирования на YAC+ среде в зависимости от длительности предварительного культивирования на среде без YAC.

*** - различия с контролем статистически достоверны при $p \leq 0.05$.**

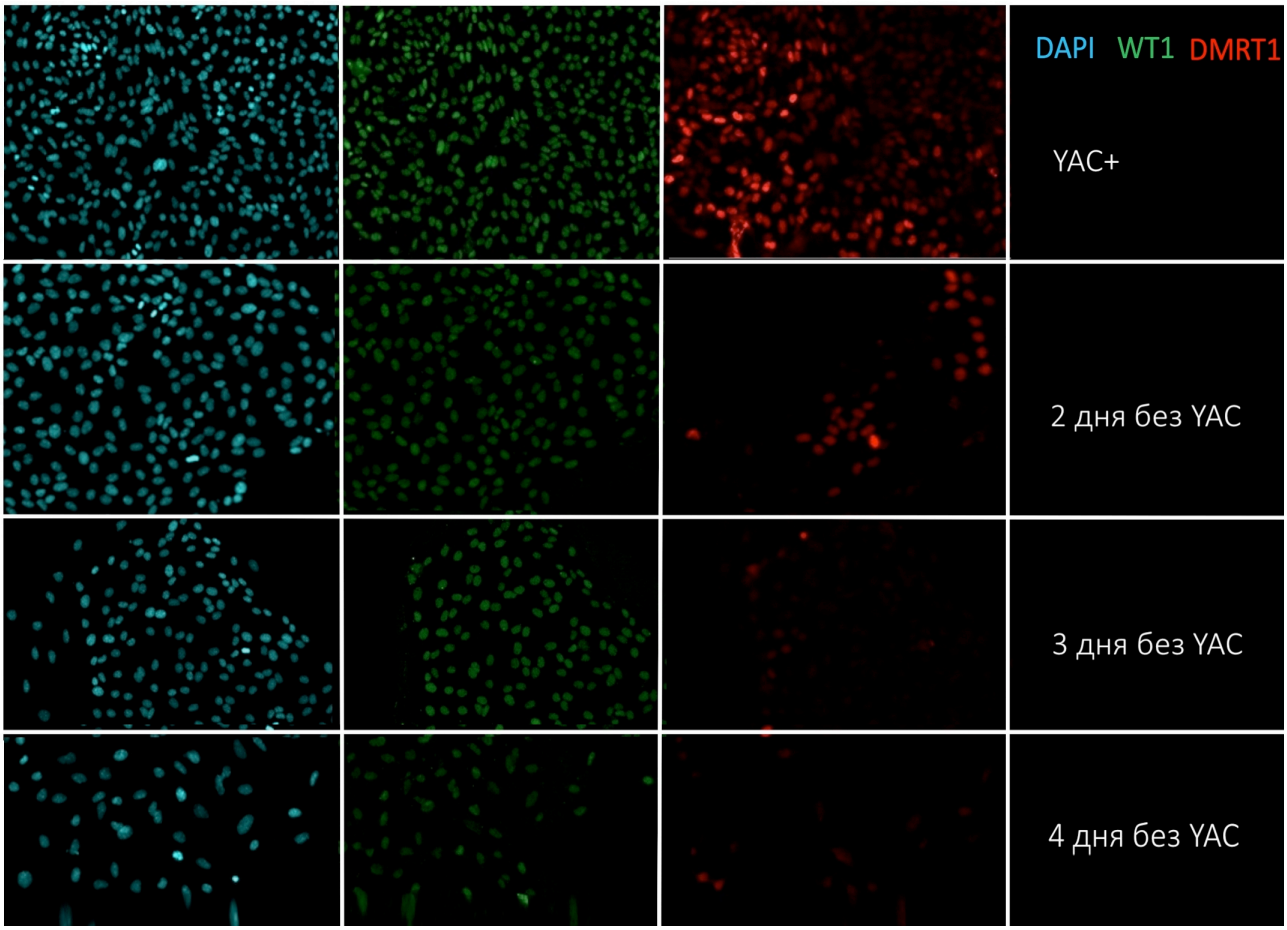

Рис. 8. Репрезентативные фотографии колоний СПК на 9 сут культуры на YAC+ среде после предварительно культивирования на YAC- среде в течении разного времени.
Окраска на маркеры КС WT1 и DMRT1, ядра окрашены DAPI.

3. Изучение влияния комплекса низкомолекулярных ингибиторов YAC на пролиферативную активность Dmrt1+ и Dmrt1- СПК в культуре

Как видно из Рис. 9 на 7 сут культивирования на YAC+ среде примерно половина СПК как экспрессирующих, так и не экспрессирующих *Dmrt1* включает EdU метку. На 2 сут культивирования на YAC+/– средах, а также на 7 сутки в YAC– среде данные не представлены, так как в этих случаях DMRT1+ СПК оказалось слишком мало для проведения корректного статистического анализа. Анализ общего уровня пролиферации клеток в культуре показал, что на вторые сут культивирования доля EdU+ клеток в культуре с YAC выше, хотя

и не статистически достоверно, чем в YAC– культуре и составляет 70,0 ± 10,8%, против 51,0 ± 11,1% соответственно (рис. 10).

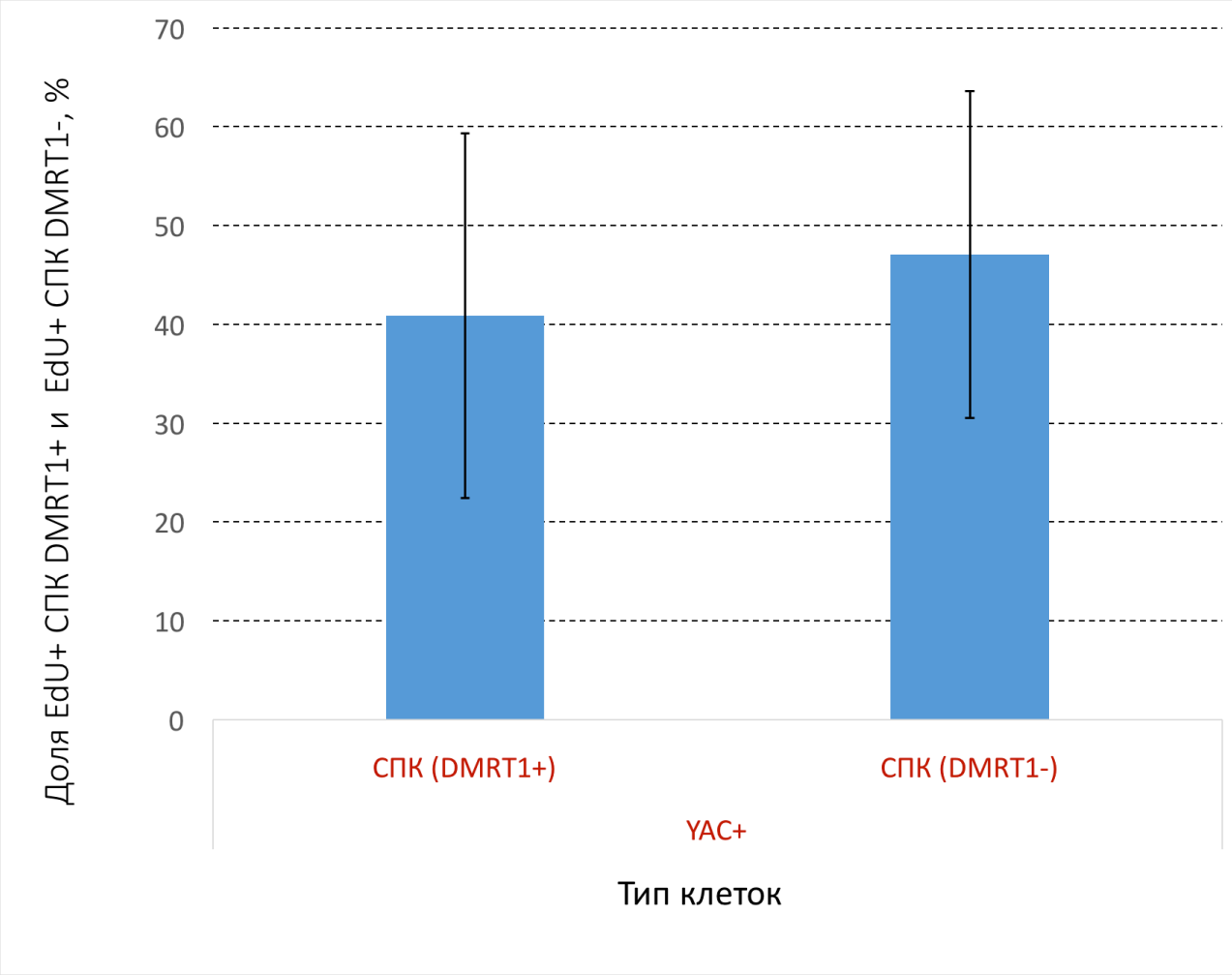

Рис. 9. Доля EdU+ клеток среди DMRT1+ и DMRT1- СПК на 9 сут культивирования.

На 7 сут культивирования явных различий в уровне клеточной пролиферации между культурами обнаружено не было (Рис. 10). На Рис. 11 представлены данные по пролиферации среди СПК на 2 и 7 сут культивирования на средах с и без YAC, как видно результаты согласуется с общим уровнем пролиферации в культуре, и доля EdU+ СПК составляет на 2 сут 82,2 ± 11,6% и 67,1 ± 8,1 %, на 7 сут 45,2 ± 17,8 % и 41,8 ± 11,4 % соответственно.

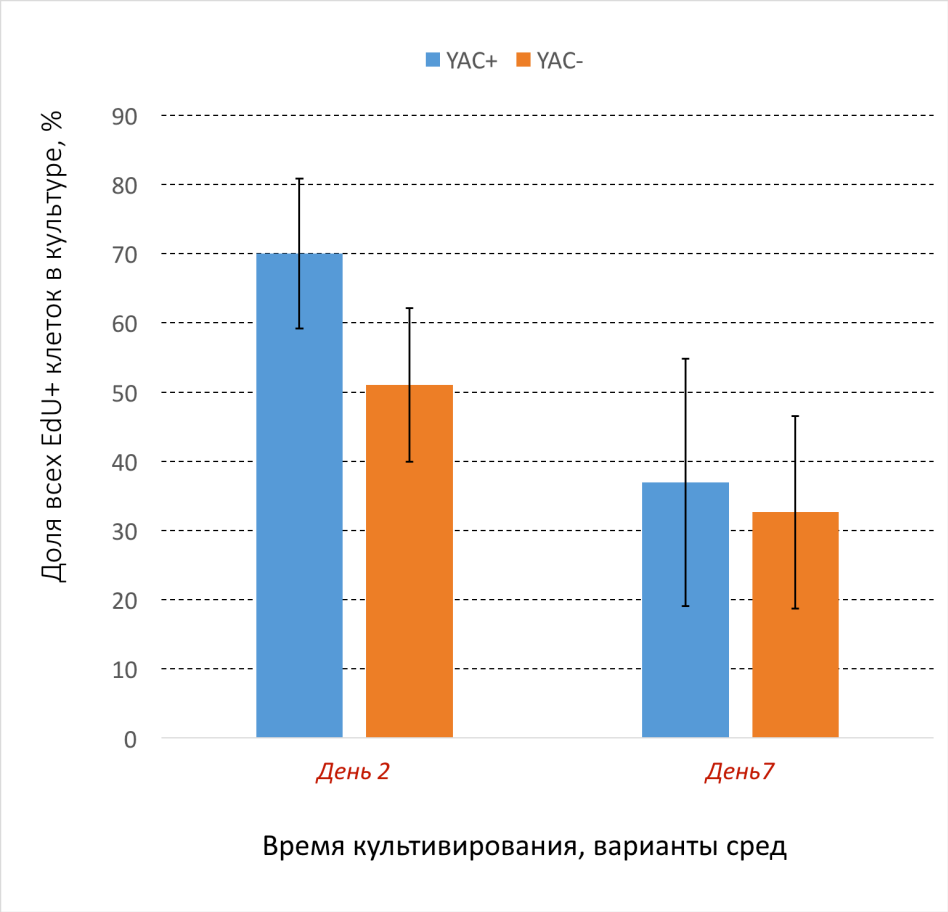

Рис. 10. Доля EdU+ клеток в культурах с и без добавления YAC на 2 и 7 сут культивирования.

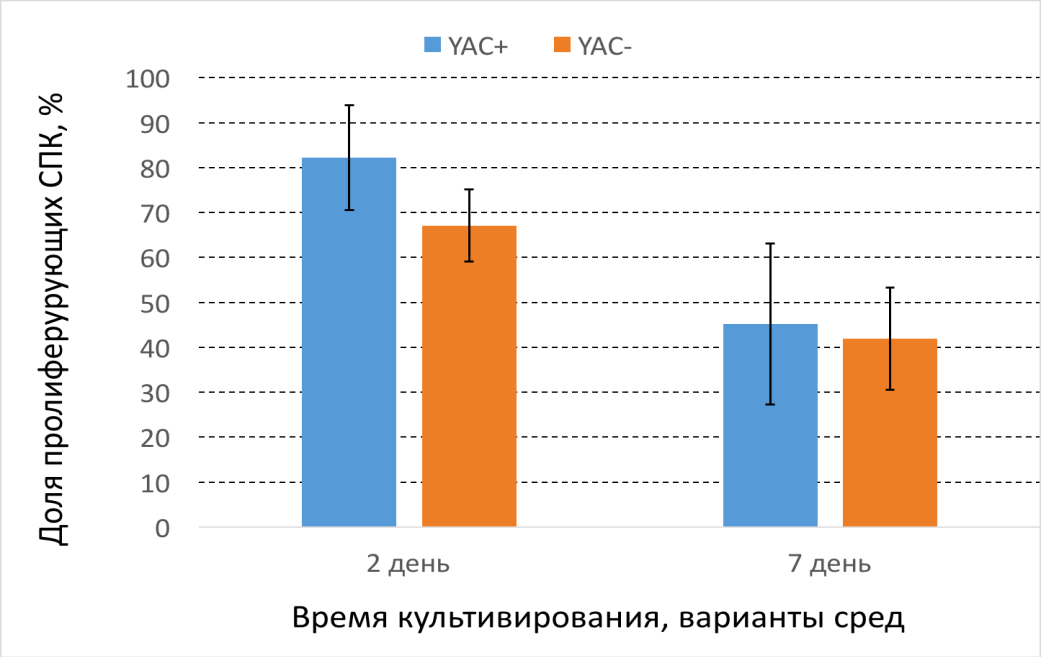

Рис. 11. Доля EdU+ СПК в культурах с и без добавления YAC на 2 и 7 сут культивирования.

В первичных культурах СПК на всех средах, помимо колоний WT+ СПК, присутствуют также WT1-отрицательные перитубулярно-мышечные клетки (ПМК), представленные на репрезентативных фотографиях на 7 сут культивирования (Рис. 12). При культивировании с YAC доля EdU+ ПМК на 2 сутки составляет 57,2 ± 6,7%, в YAC– среде 38,9 ± 10,5% и статистически не различается между культурами. На 7 сут различий в пролиферации ПМК между обоими средами выявлено не было (Рис.13).

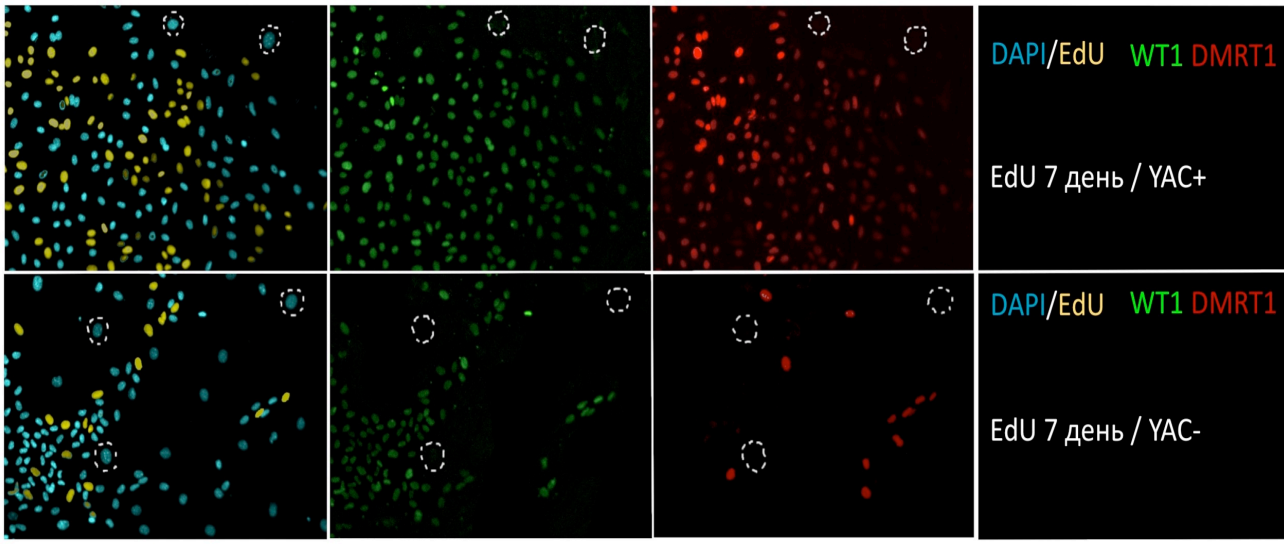

Рис. 12. Репрезентативные фотографии колоний СПК на YAC+ и YAC- среде на 7 сут культивирования. Пунктиром обозначены ПМК. Окраска на EdU и маркеры КС WT1 и DMRT1, ядра окрашены DAPI.

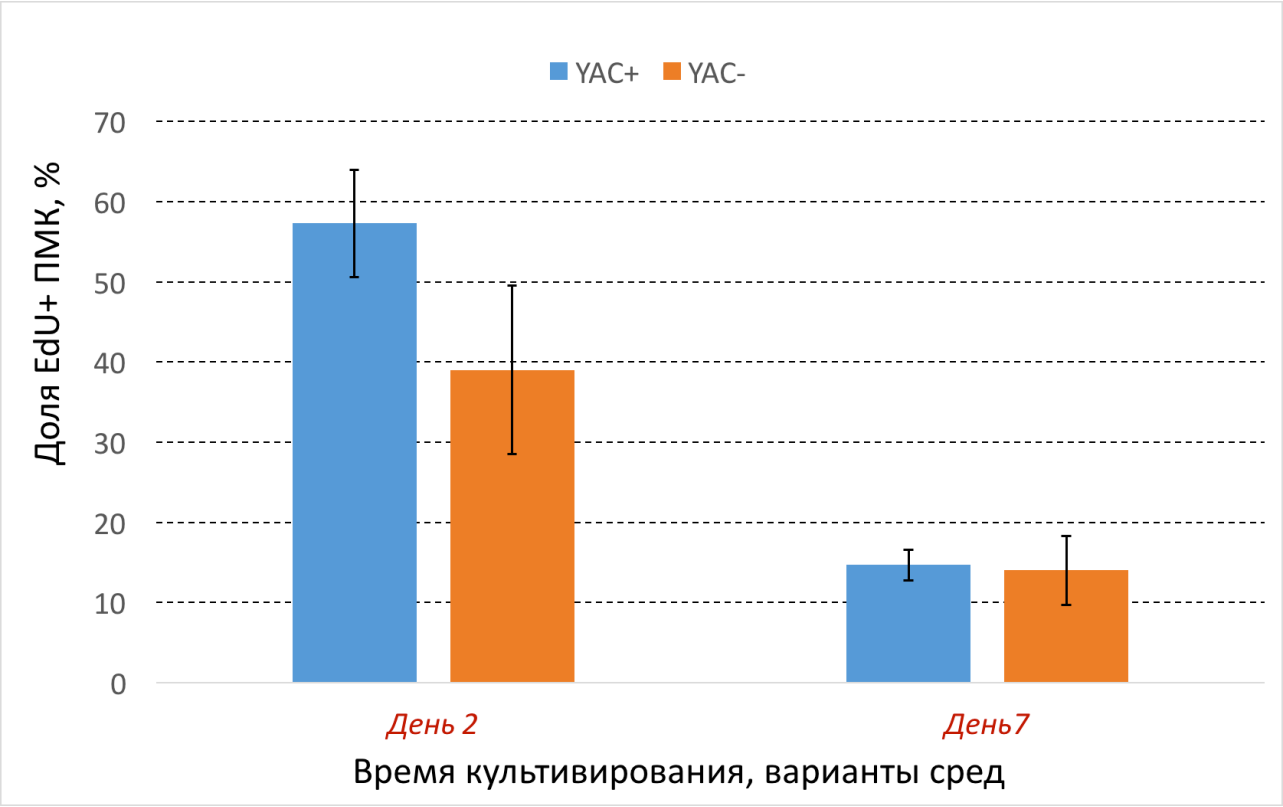

Рис. 13. Доля EdU+ ПМК в культурах с и без добавления YAC на 2 и 7 сут культивирования.

Из результатов, полученных во всех экспериментах видно, что добавление YAC к среде культивирования статистически достоверно увеличивает в культуре долю СПК экспрессирующих Dmrt1 и это не связано с особенностями прикрепления DMRT1+/– клеток к матригелю или с увеличенной пролиферацией DMRT1+ СПК. Исходя из этого мы предполагаем, что увеличение доли DMRT1+ СПК на среде с YAC связано с постепенным появлением клеток, экспрессирующих этот фактор в процессе культивирования. Интересно, что подавление экспрессии *Dmrt1* методом РНК-интерференции в КС из извитых семенных канальцев приводит к активации их пролиферации, что согласуется с представлениями о роли этого гена в дифференцировке КС (Малолина, Кулибин, 2018). В этой связи также интересны и другие данные, что в процессе полового созревания в СПК, расположенных в сети семенника, происходит резкое 5 раз снижение доли Dmrt1+ клеток между 11-12 сут постнатального развития (не опубликованные

данные) и далее у взрослых мышей только единичные клетки экспрессируют этот фактор (Malolina, Kulibin, 2019), что свидетельствует об расхождении в путях дифференцировки СПК и КС. Таким образом, добавление YAC к среде культивирования позволяет приблизить СПК к КС в культуре и в наших будущих исследованиях мы проверим их способность к поддержанию дифференцировки половых клеток в культуре.

ВЫВОДЫ

1. YAC не способствует преимущественной посадке Dmrt1-положительных СПК.
2. Чувствительность СПК к действию YAC уменьшается со временем культивирования на среде без YAC.
3. YAC не способствует преимущественной пролиферации ни Dmrt1-положительных, ни Dmrt1-отрицательных СПК в культуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А. Комплекс низкомолекулярных ингибиторов YAC увеличивает уровень экспрессии Dmrt1 в клетках Сертоли транзиторной зоны семенника мыши в культуре // Гены & Клетки. 2018. Т. 13. № 3. С. 75-81.
2. Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Пролиферативная активность клеток Сертоли извитых семенных канальцев мыши в культуре // Цитология. 2018. Т. 60. №4. С. 308-315.
3. Ahmed E.A., Barten R.A., Kal H.B., Sadri-Ardekani H., Mizrak S.C., Pelt A.M., Rooij D.G. Proliferative activity in vitro and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells // Biol. Reprod. 2009. V. 80. № 6. P. 1084–109
4. Yoshimi A., Naoki T., Kasane K., Miyuri K., Hitomi S., Masami K., Masamichi K., Yoshiakira K. A Niche for GFRα1-Positive Spermatogonia in the Terminal Segments of the Seminiferous Tubules in Hamster Testes // Stem Cells. 2015. V. 33. № 9. P. 2811–2824.
5. Beumer T.L., Kiyokawa H., Roepers-Gajadien H.L.,van den Bos L.A., Lock T.M., Gademan I.S., Rutgers D.H., Koff A., de Rooij D.G. Regulatory role of p27kip1 in the mouse and human testis // Endocrinology. 1999. V. 140. № 4. P. 1834–1840.
6. Bowles J., Knight D., Smith C., Wilhelm D., Richman J., Mamiya S., Yashiro K., Chawengsaksophak K., Wilson M.J., Rossant J., Hamada H., Koopman P. Retinoid signaling determines germ cell fate in mice // Science. 2006. V. 312. № 5773. P. 596–600.
7. Burgos M.H., Fawcett D.W. Studies on the fine structure of the mammalian testis. I. Differentiation of the spermatids in the cat (Felis domestica) // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1955. V. № 4. P. 287–300.
8. Chen C., Ouyang W., Grigura V., Zhou Q., Carnes K., Lim H., Zhao G., Arber S., Kurpios N., Murphy T.L., Cheng A.M., Hassell J.A., Chandrashekar V., Hofmann

M., Hess R.A., Murphy K.M. ERM is required for transcriptional control of the spermatogonial stem cell niche // Nature. 2005. V. 436. № 7053. P. 1030–1034.

9. Dorrington J.H., Armstrong D.T. Follicle-stimulating hormone stimulates estradiol-17beta synthesis in cultured Sertoli cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1975. V. 72. № 7. P. 2677–2681.
10. Doyle T.J., Kaur G., Putrevu S.M, Dyson E.L., Dyson M., McCunniff W.T., Pasham M.R., Kim K.H., Dufour J.M. Immunoprotective properties of primary Sertoli cells in mice: potential functional pathways that confer immune privilege // Biol. Reprod. 2012. V. 86. № 1. P. 1–14.
11. Dym M. The fine structure of monkey Sertoli cells in the transitional zone at the junction of the seminiferous tubules with the tubuli recti // Am. J. Anat. 1974. V. 140. № 1. P. 1–25.
12. Dym M., Cavicchia J.C. Further observations on the blood-testis barrier in monkeys. // Biol. Reprod. 1977. V. 17. № 3. P. 390–403.
13. Ebner V.V. Zur Spermatogenese bei den Saugethieren // Arch. Mikr. Anat. 1888. V. 31. P. 236–291.
14. FAWCETT D.W. Ultrastructure and function of the Sertoli cell // Handb. Physiol. 1975. V. 5. P. 24–55.
15. Figueiredo A.F., Franca L.R., Hess R.A., Costa G.M. Sertoli cells are capable of proliferation into adulthood in the transition region between the seminiferous tubules and the rete testis in Wistar rats. // Cell Cycle. 2016. V. 15. № 18. P. 2486–2496.
16. Franca L.R., Hess R.A., Dufour J.M., Hofmann M.C., Griswold M.D. The Sertoli cell: one hundred fifty years of beauty and plasticity. // Andrology. 2016. V. 4. № 2. P. 189–212.
17. Franca L.R., Avelar G.F., Almeida F.F.L. Spermatogenesis and sperm transit through the epididymis in mammals with emphasis on pigs // Theriogenology. 2005. V. 63. № 2. P. 300–318.
18. Franca L.R., Cardoso F.M. Duration of spermatogenesis and sperm transit time through the epididymis in the Piau boar // Tissue cell. 1998. V.5. №5. P. 573-582.

19. Fröjdman K., Harley V.R., Pelliniemi L.J. Sox9 protein in rat sertoli cells is age and stage dependent // Histochem. Cell Biol. 2000. V. 113. № 1. P. 31–36.
20. Griswold M.D. Action of FSH on mammalian Sertoli cells // In: The Sertoli Cell, Griswold M.D. and Russell L.D. (ed.), Cache River Press. 1993. P. 493–508.
21. Griswold M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis // Semin. Cell Dev. Biol. 1998. V. 9. № 4. P. 411–416.
22. Guo J., Tao S., Chen M., Shi Y., Zhang Z., Li Y., Zhang X., Hu Z., Liu Y. Heat treatment induces liver receptor homolog-1 expression in monkey and rat Sertoli cells // Endocrinology. 2007. V. 148. № 3. P. 1255–1265.
23. Hess R., Franca L. Spermatogenesis and Cycle of the Seminiferous Epithelium // Advances in experimental medicine and biology. , 2008. P. 1–15.
24. Hess R., Vogl A. Sertoli cell anatomy and cytoskeleton. , 2015. P. 1–55.
25. Hess R.A., Franca L.R. Chapter 1 // In: History of the Sertoli Cell Discovery, Skinner M.K. and Griswold M.D. (ed.), San Diego: Academic Press. 2005a. P. 3–13.
26. Hess R.A., Franca L.R. Chapter 3 // In: History of the Sertoli Cell Discovery, Skinner M.K. and Griswold M.D. (ed.), San Diego: Academic Press. 2005b. P. 19–40.
27. Hochereau-de Reviers M.T., Lincoln G.A. Seasonal variation in the histology of the testis of the red deer, Cervus elaphus // J. Reprod. Fertil. 1978. V. 54. № 2. P. 209–213.
28. Hogarth C.A., Griswold M.D. The key role of vitamin A in spermatogenesis // J. Clin. Invest. 2010. V. 120. № 4. P. 956–962.
29. Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye J., Yang W., Liu K., Ge J., Xu J., Zhang Q., Zhao Y., Deng H. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds // Science. 2013. V. 341. № 6146. P. 651–654.
30. Johnston D.S., Russell L.D., Friel P.J., Griswold M.D. Murine germ cells do not require functional androgen receptors to complete spermatogenesis following spermatogonial stem cell transplantation // Endocrinology. 2001. V. 142. № 6. P.

2405–2408.

31. Katsuda T., Kawamata M., Hagiwara K., Takahashi R., Yamamoto Y., Camargo F.D., T. Ochiya. Conversion of Terminally Committed Hepatocytes to Culturable Bipotent Progenitor Cells with Regenerative Capacity // Cell Stem Cell. 2017. V. 20. № 1. P. 41–55.
32. Kawamata M., Ochiya T. Generation of genetically modified rats from embryonic stem cells // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010. V. 107. № 32. P. 14223–14228.
33. Kulibin A.Y., Malolina E.A. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture // Reproduction. 2016. V. 152. № 4. P. 271–281.
34. Kulibin A.Y., Malolina E.A. Sertoli cells cultured under high-temperature and hypoxic conditions // Cell tissue biol. 2014. V. 8. № 2. P. 97–106.
35. Kyrönlahti A., Euler R., Bielinska M., Schoeller E.L., Moley K.H., Toppari J., Heikinheimo M., Wilson D.B. GATA4 regulates Sertoli cell function and fertility in adult male mice // Mol. Cell. Endocrinol. 2011. V. 333. № 1. P. 85–95.
36. Leblond C.P., Clermont Y. Definition of the stages of the cycle of the seminiferous epithelium in the rat // Ann. N. Y. Acad. Sci. 1952. V. 55. № 4. P. 548–573.
37. Malolina E.A., Kulibin A.Y. The rete testis harbors Sertoli-like cells capable of expressing Dmrt1 // Reproduction. 2019. V. 158. №5. P. 399-413.
38. Matson C.K., Murphy M.W., Sarver A.L., Griswold M.D., Bardwell V.J., Zarkower D. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis // Nature. 2011. V. 476. № 7358. P. 101–104.
39. McClusky L.M., Patrick S., Barnhoorn I.E., Dyk J.C., Jager C., Bornman M.S. Immunohistochemical study of nuclear changes associated with male germ cell death and spermiogenesis // J. Mol. Histol. 2009. V. 40. № 4. P. 287.
40. Neto F.T., Bach P.V., Najari B.B., Li P.S., Goldstein M. Spermatogenesis in humans and its affecting factors // Semin. Cell Dev. Biol. 2016. V. 59. P. 10–26.
41. Nykänen M. Fine structure of the transitional zone of the rat seminiferous tubule // Cell Tissue Res. 1979. V. 198. № 3. P. 441–454.

42. Osman D.I. On the ultrastructure of modified Sertoli cells in the terminal segment of seminiferous tubules in the boar // J. Anat. 1978. V. 127. № Pt 3. P. 603–613.
43. Russell L. Movement of spermatocytes from the basal to the adluminal compartment of the rat testis // Am. J. Anat. 1977. V. 148. № 3. P. 313–328.
44. Russell L.D., Ettlin R.A., Hikim A.P., E.D. Clegg. Histological and Histopathological Evaluation of the Testis // Int. J. Androl. 1993. V. 16. № 1. P. 83–83.
45. Russell L.D. Form, dimensions and cytology of mammalian Sertoli cells // Sertoli Cell. 1993. P. 1–37.
46. Russell L.D. Sertoli-germ cell interrelations: A review // Gamete Res. 1980. V. 3. № 2. P. 179–202.
47. Sar M., Lubahn D.B., French F.S., Wilson E.M. Immunohistochemical localization of the androgen receptor in rat and human tissues // Endocrinology. 1990. V. 127. № 6. P. 3180–3186.
48. Schulze C., Holstein A.F., Schirren C., Körner F. On the morphology of the human Sertoli cells under normal conditions and in patients with impaired fertility // Andrologia. 1976. V. 8. № 2. P. 167–178.
49. Setchell B.P. Foreword // In The Sertoli Cell, Griswold M.D. and Russell
50. L.D. (ed.), Cache River Press.1993. P. 5-7.
51. Sharpe R.M., McKinnell C., Kivlin C., Fisher J.S. Proliferation and functional maturation of Sertoli cells, and their relevance to disorders of testis function in adulthood // Reproduction. 2003. V. 125. № 6. P. 769–784.
52. Skinner M.K., Griswold M.D. Sertoli cells synthesize and secrete a ceruloplasmin-like protein // Biol. Reprod. 1983. V. 28. № 5. P. 1225–1229.
53. Skinner M.K., Griswold M.D. Sertoli cells synthesize and secrete transferrin-like protein // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 20. P. 9523–9525.
54. Smith B.E., Braun R.E. Germ cell migration across Sertoli cell tight junctions // Science. 2012. V. 338. № 6108. P. 798–802.
55. Snyder E.M., Small C., Griswold M.D. Retinoic acid availability drives the

asynchronous initiation of spermatogonial differentiation in the mouse // Biol. Reprod. 2010. V. 83. № 5. P. 783–790.

56. Steinberger E. Hormonal regulation of the seminiferous tubule function // Curr. Top. Mol. Endocrinol. 1975. V. 2. P. 337–352.

57. Svingen T., Koopman P. Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations // Genes Dev. 2013. V. 27. № 22. P. 2409–2426.

58. Sylvester S.R., Griswold M.D. The testicular iron shuttle: a “nurse” function of the Sertoli cells // J. Androl. 1994. V. 15. № 5. P. 381–385.

59. Tarulli G.A., Stanton P.G., Lerchl A., Meachem S.J. Adult sertoli cells are not terminally differentiated in the Djungarian hamster: effect of FSH on proliferation and junction protein organization // Biol. Reprod. 2006. V. 74. № 5. P. 798–806.

60. Tarulli G.A., Stanton P.G., Meachem S.J. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? // Biol. Reprod. 2012. V. 87. № 1. P. 1- 11,13.

61. Tsutsui H., Valamehr B., Hindoyan A., Qiao R., Ding X., Guo S., Witte O.N., Liu X., Ho C., Wu H. An optimized small molecule inhibitor cocktail supports long-term maintenance of human embryonic stem cells // Nat. Commun. 2011. V. 2. P. 167.

62. Wang X.N., Li Z.S., Ren Y., Jiang T., Wang Y.Q., Chen M., Zhang J., Hao J.X., Wang Y.B., Sha R.N., Huang Y., Liu X., Hu J.C., Sun G.Q., Li H.G., Xiong C.L., Xie J., Jiang Z.M., Cai Z.M., Wang J., Wang J., Huff V., Gui Y.T., Gao F. The Wilms tumor gene, Wt1, is critical for mouse spermatogenesis via regulation of sertoli cell polarity and is associated with non-obstructive azoospermia in humans // PLoS Genet. 2013. V. 9. № 8. P. e1003645.

63. Weber J.E., Russell L.D. A study of intercellular bridges during spermatogenesis in the rat // Am. J. Anat. 1987. V. 180. № 1. P. 1–24.

64. Yomogida K., Ohtani H., Harigae H., Ito E., Nishimune Y., Engel J.D., Yamamoto M. Developmental stage- and spermatogenic cycle-specific expression of transcription factor GATA-1 in mouse Sertoli cells // Development. 1994. V. 120. № 7. P. 1759–1766.

65. Zebrun W., Mollenhauer H.H. Electron microscopic observations on mitochondria of rat testes fixed in potassium permanganate // J. Biophys. Biochem. Cytol. 1960. V. 7. № 2. P. 311–314.

66. Zhang K. et al In Vitro Expansion of Primary Human Hepatocytes with Efficient Liver Repopulation Capacity // Cell Stem Cell. 2018. V. 23. № 6. P. 806- 819.e4.

67. Zhang X.S., Zhang L., Liu W., Ma X., Cen J., Sun Z., Wang C., Feng S., Zhang Z., Yue L., Sun L., Zhu Z., Chen X., Feng A., Wu J., Jiang Z., Li P., Cheng X., Gao D., Peng L., Hui L. Dedifferentiation of adult monkey Sertoli cells through activation of extracellularly regulated kinase 1/2 induced by heat treatment // Endocrinology. 2006. V. 147. № 3. P. 1237–1245.

68. Hai Y., Hou J., Liu Y., Liu Y., Yang H., Li Z., He Z. The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. // Semin. Cell Dev. Biol. 2014. V.29. P.66–75.