

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

ФГБУН ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

УДК 576.53:54.

№ ИС ГЗ 0108-2015-0063



УТВЕРЖДАЮ  
Директор ИБР РАН  
Член-корреспондент РАН

А.В. Васильев

«27» января 2017 г.

ОТЧЕТ

О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА НОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ КЛЕТочНОЙ ТЕРАПИИ ТЯЖЕЛЫХ ФОРМ  
МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ, ОСНОВАННОЙ НА СОВМЕСТНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В  
ЯИЧКИ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И  
КЛЕТОК ИХ МИКРООКРУЖЕНИЯ

Программы Президиума РАН П.1П «Фундаментальные исследования для разработки  
медицинских технологий»

(отчет за 2016 г.)

Руководитель темы, к.б.н., с.н.с.

А.Ю. Кулибин

подпись, дата

Москва, 2017

## СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель, кандидат биологических  
наук



---

подпись, дата

А.Ю. Кулибин

Исполнители:  
Кандидат биол. наук



---

подпись, дата

Е.А. Малолина

## СОДЕРЖАНИЕ

Реферат	4
Обозначения и сокращения	5
Результаты	6
Публикации по теме	10

**Разработка новой технологии клеточной терапии тяжелых форм мужского бесплодия, основанной на совместной трансплантации в яички сперматогониальных стволовых клеток и клеток их микроокружения.**

Отчет 10 с., 1 ч., 3 рис.,

Реферат

В последнее время идея использования стволовых клеток для трансплантации с целью репарации различных нарушений получила широкое распространение. Однако часто такой подход не приводит к эффективному восстановлению поврежденной ткани. Одна из причин этого – нарушение структуры и функции микроокружения стволовых клеток. Поэтому целью работы стало изучение возможности использования для клеточной терапии мужского бесплодия совместных трансплантаций сперматогониальных стволовых клеток (ССК) и клеток их микроокружения – клеток Сертоли (КС).

На первом этапе проекта для исследования терапевтического эффекта трансплантаций были выбраны две животные модели нарушения сперматогенеза – герпесвирусная модель, где повреждены как ССК так и КС и экспериментальный крипторхизм у крыс, нарушающий функцию КС. На модели вирусной инфекции семенника нами установлено, что трансплантация ССК и КС, полученных от неонатальных животных, приводит к восстановлению сперматогенной ткани и сперматогенного процесса у реципиентов за счет трансплантированных клеток. На модели двустороннего абдоминального крипторхизма у крыс продемонстрировано, что через 3 мес после трансплантации неонатальных КС в интерстиций семенника доля семенных канальцев с нормальным сперматогенезом составила 38%, а в контрольных группах не превышала 2%. В данном случае, по-видимому, имеет место паракринное воздействие трансплантированных клеток на поврежденное в результате крипторхизма микроокружение ССК. В обеих описанных моделях для трансплантаций использованы клетки неонатальных животных, что не подходит для терапевтического применения, поэтому следующим этапом работы стала разработка методов культивирования КС взрослых животных и оценка их морфогенетического потенциала.

Ключевые слова: мужское бесплодие, сперматогониальные стволовые клетки, клетки Сертоли, герпесвирусная модель, экспериментальный крипторхизм.

Содержание отчета

**Цель проекта.** Разработка новой технологии клеточной терапии мужского бесплодия, обусловленного повреждением сперматогенеза в результате воспалительных, инфекционных и иных процессов, ведущих к нарушению функции клеток микроокружения ССК.

**Задачи проекта.** Для усовершенствования методики культивирования клеток микроокружения ССК (КС) провести культивирование КС, полученных от неонатальных и половозрелых

животных, в условиях бессывороточной прикрепленной культуры. Охарактеризовать КС из разных вариантов культуры с помощью ПЦР-РВ и иммунофлуоресцентного метода. Провести 3D-культивирование выращенных в культуре КС для оценки их морфогенетических и функциональных свойств.

**Название проекта.** Разработка новой технологии клеточной терапии тяжелых форм мужского бесплодия, основанной на совместной трансплантации в яички сперматогониальных стволовых клеток и клеток их микроокружения.

**Руководитель работ:** Кулибин Андрей Юрьевич, кандидат биологических наук. Тел.: 89161729714. Email: [kulibin.a.bkrj@gmail.com](mailto:kulibin.a.bkrj@gmail.com). ФГБУН Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН. Выделенное финансирование: 1 150 019,00 руб.

**Цель проекта.** Разработка новой технологии клеточной терапии мужского бесплодия, обусловленного повреждением сперматогенеза в результате воспалительных, инфекционных и иных процессов, ведущих к нарушению функции клеток микроокружения сперматогониальных стволовых клеток (ССК).

**Задачи на 2016 г.** Определить различия (на уровне экспрессии) между двумя популяциями клеток Сертоли (КС) из семенников взрослых животных и оптимизировать условия культуры для поддержания пролиферации КС и сохранения ими своих морфогенетических свойств.

#### **Обозначения и сокращения:**

КС – клетки Сертоли

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени

ССК- сперматогониальные стволовые клетки

ДП - дермальная папилла

МТТ-тест — колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток, используется краситель МТТ – желтый тетразол (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразол)

**Результаты:** Для определения различий между популяцией КС извитых семенных канальцев (Seminiferous Tubules) – ST КС, и КС из переходной зоны семенников (Transitional Zone, располагается на границе извитых семенных канальцев и начального отдела семявыводящих путей, сети семенника) – TZ КС, было проведено их раздельное культивирование и последующий иммунофлуоресцентный и ПЦР РВ анализы. Установлено, что обе популяции КС экспрессируют один из основных маркеров КС Sox9 (рис. 1А, Б), присутствующий как в дифференцированных, так и в недифференцированных клетках. В то же время TZ КС, по сравнению с ST КС, показывают повышенный уровень экспрессии Krt8/18, маркера недифференцированных клеток, и пониженный – Dmrt1, маркера дифференцированных клеток. Иммунофлуоресцентный анализ показал, что в колониях TZ КС присутствуют клетки, ярко окрашивающиеся на Krt8/18 и Dmrt1, а также клетки, слабо окрашивающиеся на эти маркеры или не окрашивающиеся вообще (рис. 1В, Д). В то время как ST КС никогда не окрашиваются на Krt8/18 (рис. 1В, стрелки) и всегда окрашиваются на Dmrt1 (рис. 1Г). Причем нами установлено, что такая гетерогенность TZ КС наблюдается уже со 2 сут культуры.

Интересно, что TZ КС, в отличие от ST КС, в культуре начинают экспрессировать Acta2, гладкомышечный актин (рис. 1Е, Ж), причем его экспрессия появляется и растет с появлением и разрастанием колоний TZ КС. Acta2 часто оказывается маркером эпителио-мезенхимального перехода (ЕМТ), поэтому, для дальнейшего изучения этого явления, нами было проведено измерение экспрессии других генов-маркеров ЕМТ: Snai1 и Twist1. Оказалось, что оба эти гена находятся в культуре TZ КС на низком уровне (рис. 1И).

Таким образом, можно заключить, что из переходной зоны семенника половозрелой мыши можно выделить и размножить в культуре КС, которые обладают свойствами недифференцированных клеток: помимо активной пролиферации в культуре (которая отсутствует у ST КС), это экспрессия Krt8/18 и снижение экспрессии Dmrt1.

Даже появление окраски на Acta2, которое, как мы выяснили, не является свидетельством ЕМТ, можно объяснить дедифференцированным состоянием TZ КС, так как в эмбриональном развитии клетки-предшественники КС действительно экспрессируют этот маркер. Кроме того, полученные данные о гетерогенности клеток в колониях могут свидетельствовать о протекании в них процессов дифференцировки КС *in vitro*.

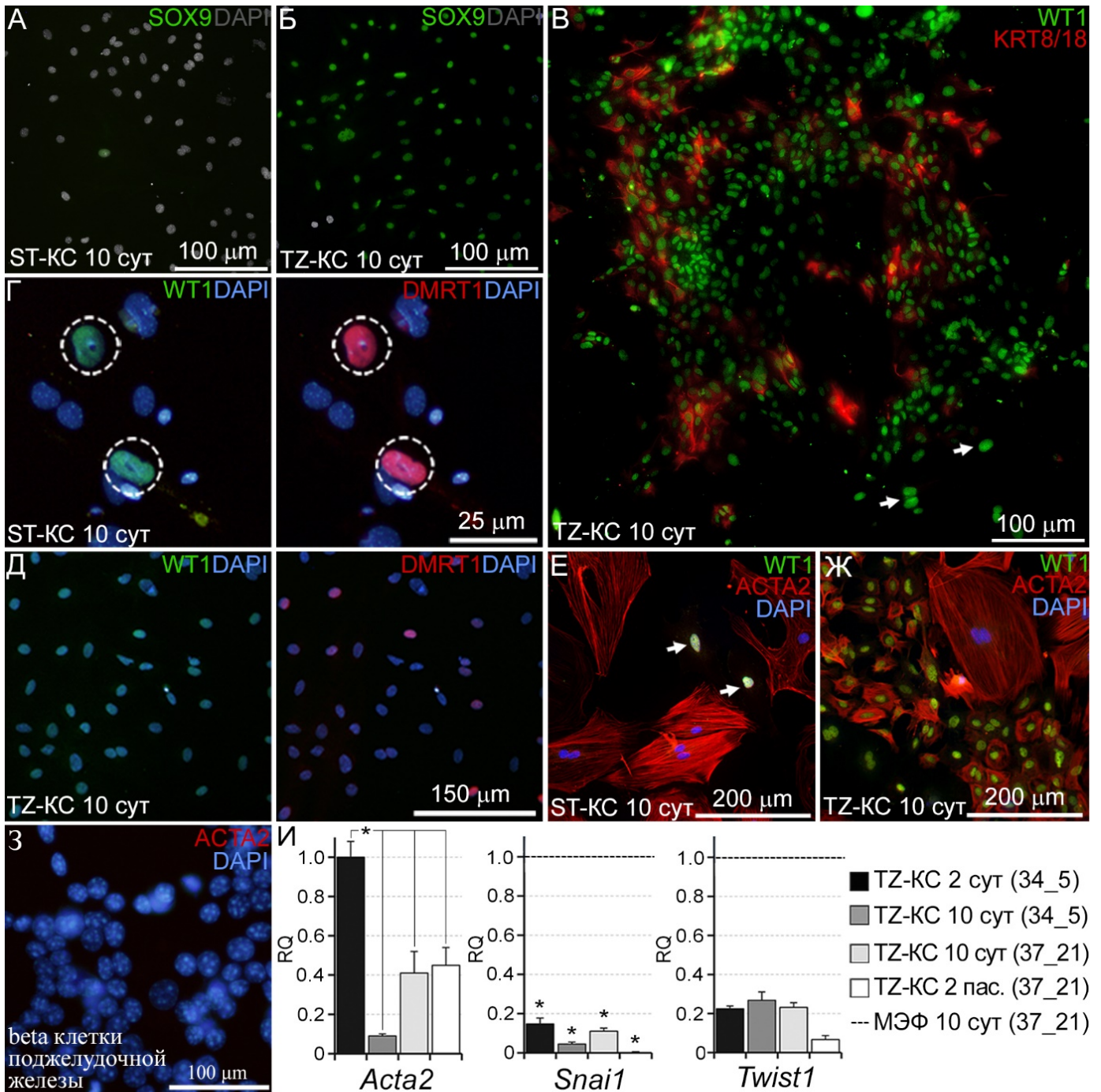


Рис. 1. Характеристика культур ST и TZ KC. Иммунофлуоресцентная окраска на Sox9 (А, Б), Wt1 и Krt8/18 (В), Wt1 и Dmrt1 (Г, Д), Wt1 и Acta2 (Е, Ж); контроль для Acta2 (З). Стрелки - примесные ST KC в культуре TZ KC; пунктиром обведены KC. ПЦР РВ анализ экспрессии *Acta2* и факторов MET в культурах TZ KC (И).

С целью оптимизации условий культуры TZ KC был проведен ряд экспериментов по изучению влияния на эти клетки в культуре различных факторов. Прежде всего, было установлено, что добиться чистой, практически без примесных клеток, культуры TZ KC можно ко 2 пассажу, когда доля  $Wt1^+$  клеток ( $Wt1$  - маркер KC, экспрессия которого в TZ KC была изучена на предыдущем этапе проекта) равнялась 93-95% (рис. 2А).

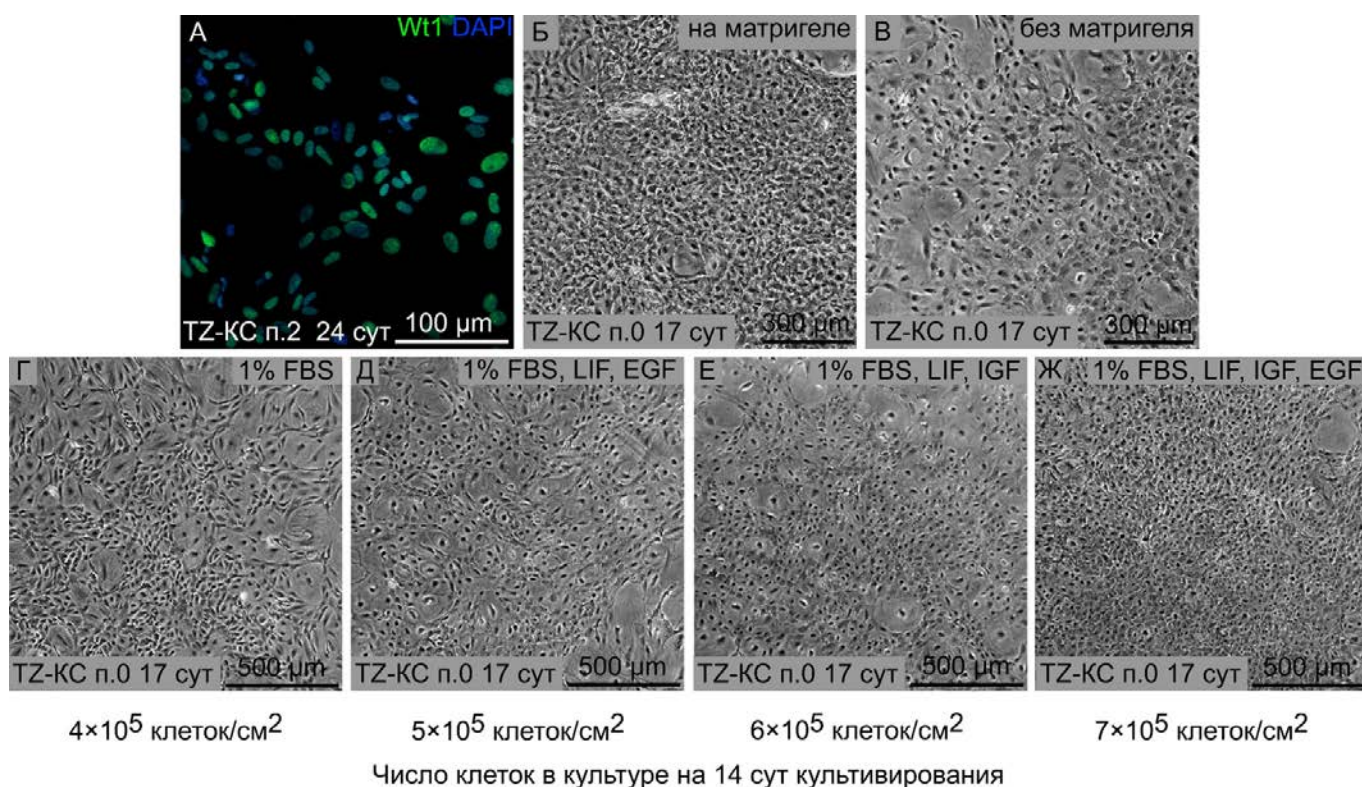


Рис. 2. Оптимизация культуры TZ КС. Экспрессия Wt1 на 2 пассаже (А). Культура TZ КС на культуральных планшетах, покрытых (Б) и не покрытых матригелем (В). Культура TZ КС, выращенная на среде с добавлением разных сочетаний ростовых факторов (Г-Ж).

Далее было продемонстрировано, что покрытие культуральных планшетов Матригелем значительно увеличивает не только степень прикрепления, но и пролиферативную активность TZ КС (рис. 2Б, В). Уровень пролиферации в колониях TZ КС также значительно повышался при добавлении к культуральной среде лейкемического ингибиторного фактора (LIF), эпидермального (EGF) и инсулиноподобного (IGF) факторов роста. Общее число клеток в культуре и размеры колоний TZ КС увеличивались в ряду: культуральная среда с 1% FBS (рис. 2Г), с 1% FBS плюс LIF и EGF (рис. 2Д), с 1% FBS плюс LIF и IGF (рис. 2Е), с 1% FBS плюс LIF, IGF и EGF (рис. 2Ж). Пассирование культур TZ КС проводили либо после 14 сут, когда колонии TZ КС достигали максимального размера, либо раньше, на 4-6 сут; поэтому общее число пассажей варьировало от 3 до 5. При этом общее время нахождения клеток в культуре равнялось 1-1.5 мес. Таким образом, нами было продемонстрировано, что TZ КС способны к достаточно длительному поддержанию и значительному размножению *in vitro*.

Для оценки функциональности культивируемых TZ КС, а именно: их способности формировать семенные каналцы *de novo*, был использован метод их совместного культивирования с клетками семенника мышонка в 3D условиях в коллагеновом геле. Для того, чтобы маркировать TZ КС в совместной культуре, эти клетки были получены от трансгенных GFP мышей. Присутствие в культуре клеток мышонка было необходимо, так как для формирования полноценных каналцев необходимы не только КС, но и другие соматические клетки семенника,



что было продемонстрировано нами на предыдущем этапе проекта. Иммунофлуоресцентный анализ культур через 7 сут культивирования показал, что в них сформировалась целая сеть канальцеподобных структур с просветами и что TZ КС (GFP+/Wt1+ клетки) принимали участие в формировании этой сети (рис. 3А, Б). В стенке сформировавшихся канальцев присутствовали как единичные TZ КС, так и целые группы этих клеток (рис. 3Г, Д). Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание культур на Wt1 и Dmrt1 показало, что бóльшая часть GFP+/Wt1+ клеток экспрессировала Dmrt1 (рис. 3Е, Ж). Это свидетельствует об успешной дифференцировке TZ КС в условиях 3D культуры. Для сравнения, аналогичные эксперименты были проведены с ST КС. В таких гелях в составе тяжей встречались только единичные GFP+/Wt1+ клетки (рис. 3В). Полученные данные убедительно свидетельствуют о функциональности TZ КС и их способности к дифференцировке в 3D условиях, максимально приближенных к *in vivo* условиям.

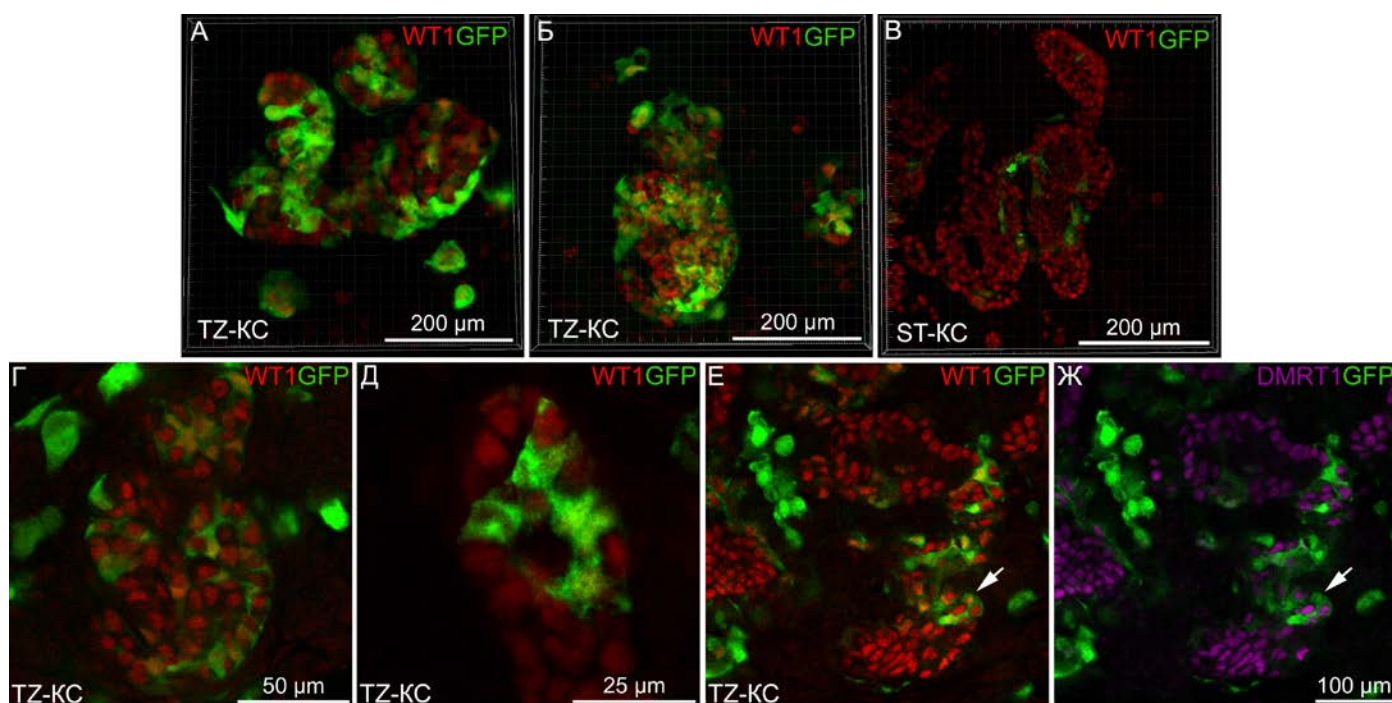


Рис. 3. Совместные культуры GFP+ TZ КС и клеток семенника мышонка, конфокальная микроскопия. Иммунофлуоресцентная окраска на Wt1 (А, Б, Г, Д); в качестве контроля представлена совместная культура клеток мышонка с ST КС (В). Иммунофлуоресцентная окраска на Wt1 и Dmrt1 (Е, Ж), стрелки - единичная Dmrt1- TZ КС.

Таким образом, результаты, полученные нами в ходе выполнения проекта в 2016 г., показывают, что популяция клеток, выделенных из переходной, транзитной зоны семенника половозрелой мыши, является источником недифференцированных КС, которые можно поддерживать и размножать в культуре, и которые, при помещении в соответствующие условия, способны дифференцироваться и формировать семенные канальцы. Для оценки способности этих клеток поддерживать полноценный сперматогенный процесс необходимы дальнейшие исследования.

## **Публикации по теме**

Количество научных публикаций в журналах, индексируемых в международной информационно-аналитической системе научного цитирования **Web of Science**

Malolina E.A., Kulibin A.Y., Kushch A.A. Neonatal testicular cell transplantation restores murine spermatogenesis damaged in the course of herpes simplex virus-induced orchitis // *Reprod. Fertil. Dev.* 2016. V. 28(6). P. 757-764. DOI: 10.1071/RD14255 (была в отчете за 2014 г как принятая к печати, вышла в 2016 г).

**Также по результатам проекта подготовлена к печати статья:** Е.А. Малолина, А.Ю. Кулибин. Изучение области сети семенника и прилегающих к ней семенных канальцев в постэмбриональном развитии мыши. Предполагаемый журнал: *Онтогенез*.

Запланированный в ГЗ на 2016 год показатель, характеризующий объем работ, выполнен.

Отчет по Программе Президиума РАН утвержден решением Ученого совета ИБР РАН « 27 » декабря 2016 г., протокол № 14