

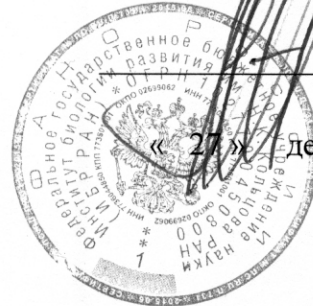
Федеральное агентство научных организаций
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ РАЗВИТИЯ ИМ. Н.К. КОЛЬЦОВА РАН

№ ИНГЗ 0108-2015-0063

№ НИОКТР АААА-А16-116120810099-8

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБР РАН
Член-корреспондент РАН

_____ А.В. Васильев



« 27 » декабря 2017 г.

ОТЧЕТ
О НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЕ

РАЗРАБОТКА НОВОЙ ТЕХНОЛОГИИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ТЯЖЕЛЫХ ФОРМ
МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ, ОСНОВАННОЙ НА СОВМЕСТНОЙ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В
ЯИЧКИ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТЕЛОВЫХ КЛЕТОК И КЛЕТОК ИХ
МИКРООКРУЖЕНИЯ
(заключительный)

Руководитель темы

_____ 27.12.2017

подпись, дата


Кулибин А.Ю.

Москва, 2017

СПИСОК ИСПОЛНИТЕЛЕЙ

Руководитель проекта


к.б.н., с.н.с.


_____ 27.12.2017
подпись, дата

Кулибин А.Ю. (Введение, Заключение
разделы 1-3)

Исполнитель проекта

к.б.н., н.с.


_____ 27.12.2017
подпись, дата

Малолина Е.А. (Разделы 4-6)

РЕФЕРАТ

Отчет 27 с., 1 ч., 10 рис., 28 источников, 1 приложение.

КЛЕТКИ СЕРТОЛИ, МУЖСКОЕ БЕСПЛОДИЕ, КЛЕТОЧНАЯ ТЕРАПИЯ, ФЕРТИЛЬНОСТЬ, КРИПТОРХИЗМ, ОРХИТ, ПРОЛИФЕРАЦИЯ, 3D-КУЛЬТУРЫ

Проект направлен на разработку нового подхода в клеточной терапии некоторых форм мужского бесплодия, связанных с нарушением функции поддерживающих клеток сперматогенной системы – клеток Сертоли (КС).

Для достижения поставленной цели на первом этапе проекта на двух животных моделях нарушения сперматогенного процесса, затрагивающего КС – орхит вирусной этиологии и искусственный билатеральный крипторхизм, мы показали, что положительный эффект трансплантации клеток полученных из семенников неонатальных животных. Далее были разработаны методы 2D-культивирования КС, полученных как от неонатальных мышей, так и от взрослых половозрелых особей, являющихся более предпочтительным источником клеток для клеточной терапии. Анализ культур КС взрослых мышей показал, что в культурах присутствуют две популяции КС – ST КС, расположенные в семенниках в извитых семенных канальцах и TZ КС, расположенные в концевых участках извитых семенных канальцев (transitional zone – TZ). TZ КС в отличие от ST КС проявляют высокий пролиферативный потенциал в условиях культуры, образуют колонии клеток экспрессирующие маркеры как дифференцированных КС взрослых мышей, так и неонатальных животных. В экспериментах по помещению этих клеток в 3D-культуру нами впервые было показано, что TZ КС способны к формированию семенных канальцев *de novo* и поддержанию в них развития половых клеток по крайней мере до стадии мейоза, так же, как это делают недифференцированные КС неонатальных животных. Таким образом, найден источник КС во взрослом организме, который может быть использован для терапии тех случаев мужского бесплодия, когда повреждено микроокружение ССК и развитие половых клеток заблокировано.

Результаты работы заставляют пересмотреть представления о дифференцировке и регенеративном потенциале КС, принятые сегодня и могут быть использованы для разработки протоколов клеточной терапии мужского бесплодия человека.

СОДЕРЖАНИЕ

ОПРЕДЕЛЕНИЯ	5
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	6
ВВЕДЕНИЕ	7
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	8
РАЗДЕЛ 1. Задачи на весь срок выполнения проекта	8
РАЗДЕЛ 2. Первый этап - апробация технологии клеточной терапии мужского бесплодия на двух моделях нарушения сперматогенеза с использованием клеток, полученных из неонатального семенника	8
РАЗДЕЛ 3. Усовершенствование методики культивирования КС, полученных из неонатальных и взрослых мышей и оценка морфогенетического потенциала культивированных клеток в условиях 3D-культуры	12
РАЗДЕЛ 4. Определение различий между двумя популяциями кс из семенников взрослых животных и оптимизация условий культуры для поддержания пролиферации кс и сохранения ими своих морфогенетических свойств	22
РАЗДЕЛ 5. Изучение способности TZ КС, выращенных в культуре, поддерживать развитие половых клеток	24
РАЗДЕЛ 6. Сопоставление результатов с мировым уровнем	25
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	
ПРИЛОЖЕНИЕ 1. Библиографический список публикаций по результатам работы за весь срок выполнения проекта...	

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящем отчете применяются следующие термины с соответствующими определениями:

Клетки Сертоли – поддерживающие клетки сперматогенной системы, обеспечивающие развитие мужских половых клеток.

Стволовые сперматогониальные клетки – стволовые клетки сперматогенной системы, дающие начало всем мужским половым клеткам.

Перетубулярные мышечные клетки – клетки покрывающие стенку извитого семенного канальца с наружи, обеспечивают сокращение канальца, участвуют в регуляции сперматогенеза и образовании канальцев.

Извитые семенные канальцы – структурная единица семенника, включающая в свой состав сперматогенный эпителий, состоящий из клеток Сертоли и развивающихся половых клеток.

Транзиторные зоны извитых семенных канальцев (transitional zone) – концевые участки извитых семенных канальцев, содержащие клетки Сертоли, но не содержащие половых клеток.

Крипторхизм – неопущение яичка в мошонку, приводит к необратимому нарушению сперматогенеза в значительной части обусловленного нарушением работы клеток Сертоли.

Орхит – воспалительная реакция в яичке.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВПГ – вирус простого герпеса,

ИКСИ – от английского ICSI (IntraCytoplasmic Sperm Injection),

КС – клетки Сертоли,

НК – новые семенные канальцы,

ПМК – перитубулярные мышечные клетки,

ПЦР РВ – полимеразная цепная реакция в реальном времени,

ССК – стволовые сперматогониальные клетки,

ЭКО – экстракорпоральное оплодотворение,

TZ КС – клетки Сертоли из transitional zone извитого семенного канальца,

ST КС – клетки Сертоли извитых семенных канальцев (seminiferous tubule).

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время доля мужского фактора в развитии бесплодия составляет 30-40% [1]. Одной из тяжелых форм мужской инфертильности является необструктивная азооспермия, причиной которой могут быть различные патологии (орхит, крипторхизм, генетические повреждения и др.), приводящие к нарушению функционирования ССК и их микроокружения (поддерживающих клеток Сертоли – КС). Традиционные методы лечения таких патологий малоэффективны, поэтому поиск новых путей восстановления фертильности, основанных на клеточной терапии, становится все более актуальной задачей [2]. Эффективность совместных трансплантаций ССК и КС, полученных из семенников неполовозрелых животных, была продемонстрирована, в том числе в наших работах, на моделях химического и радиационного нарушения сперматогенеза [3-6]. В связи с этим на первом этапе проекта мы, продолжая наши исследования, впервые провели апробацию этой технологии для восстановления сперматогенеза на разработанных нами ранее моделях его повреждения, имитирующих патологии яичек человека: орхит вирусной этиологии [7, 8] и крипторхизм. Для успешного применения трансплантаций в медицинской практике необходимы стабильные источники аутологичных клеток во взрослом организме. Существующие методики позволяют поддерживать ССК человека в культуре и получать их из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [9]. В то же время источник клеток микроокружения ССК еще не найден, так как известно, что дифференцированные КС взрослых организмов теряют регенерационные свойства своих предшественников [3, 5, 6]. Однако эти клетки могут дедифференцироваться и пролиферировать при выведении в культуру [10-12], но отсутствие правильно подобранных условий [13, 14] делает невозможным их долгосрочное культивирование и препятствует разработке методов терапевтического использования КС. Поэтому второй этап настоящего проекта посвящен разработке технологии долговременного культивирования КС и проверке их терапевтических свойств с помощью 3D-культивирования в коллагеновом геле.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

РАЗДЕЛ 1. ЗАДАЧИ НА ВЕСЬ СРОК ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОЕКТА

В 2014 г. провести трансплантации ССК и клеток их микроокружения для восстановления сперматогенеза, нарушенного в результате вирусной инфекции (модель, имитирующая воспалительные патологии яичек) и после двустороннего абдоминального крипторхизма (модель, имитирующая крипторхизм у человека); проанализировать транскриптом клеток микроокружения ССК для выявления кандидатных генов, связанных с проявлением этими клетками высоких регенерационных свойств при трансплантации.

В 2015 г. для усовершенствования методики культивирования клеток микроокружения ССК (клеток Сертоли, 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.

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

В 2017 г. исследовать возможность использования популяции недифференцированных КС, присутствие которой в семенниках половозрелых мышей было продемонстрировано на предыдущих этапах проекта, для искусственной реконструкции микроокружения ССК и воссоздания сперматогенного процесса.

РАЗДЕЛ 2. ПЕРВЫЙ ЭТАП - АПРОБАЦИЯ ТЕХНОЛОГИИ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ МУЖСКОГО БЕСПЛОДИЯ НА ДВУХ МОДЕЛЯХ НАРУШЕНИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕОНАТАЛЬНОГО СЕМЕННИКА

С целью продемонстрировать возможность использования клеточных технологий для лечения мужского бесплодия были проведены трансплантации ССК и клеток их микроокружения – КС, полученных из семенников неонатальных мышей, в семенники мышей, поврежденные в ходе инфекции вирусом простого герпеса, приводящей к гибели половых и соматических клеток семенников и полной остановке продукции сперматозоидов. Трансплантации проводились совместно с антивирусной терапией ацикловиром. Через 30 сут после трансплантации клетки доноров были найдены в 12 из 13 проанализированных семенников, в них клетки доноров формировали новые семенные каналцы (НК), доля НК составила $17.8 \pm 5.5\%$. При внутриканальцевой инъекции КС мышей-доноров формировали в среднем по 1–3 НК на срез каналца реципиента (рис. 1А). При трансплантации в интерстициальную ткань клетки доноров

располагались обособленно, формируя структуру, напоминающую по форме и строению новый семенник. Внутри трансплантата располагались НК неправильной формы (рис. 1Б). В $50.4 \pm 10.4\%$ НК КС поддерживали дифференцировку ССК, по крайней мере, до стадии сперматоцитов, а в $14.2 \pm 2.0\%$ НК – и до стадии округлых сперматид, причем сперматогенный эпителий имел нормальную, правильную организацию (рис. 1В). Эффективность приживания клеток доноров в семенниках мышей, нарушенных ВПГ, была оценена в отдаленные сроки: на 60 и 150 сут после трансплантации. Установлено, что трансплантированные клетки располагались в семенных канальцах или в интерстициальной ткани, занимая значительную площадь семенника реципиента, особенно в случае инъекции в интерстиций. В большей части НК присутствовали половые клетки, причем во многих случаях их дифференцировка доходила до конца: в сперматогенном эпителии были обнаружены удлиняющиеся сперматиды (рис. 1Г) – практически зрелые половые клетки, широко используемые в медицинской практике для ЭКО методом ИКСИ. Часто удлиняющиеся сперматиды располагались в окружении менее дифференцированных половых клеток – сперматоцитов и округлых сперматид, что свидетельствует о непрерывности сперматогенного процесса и о функциональности заново сформированной сперматогенной ткани.

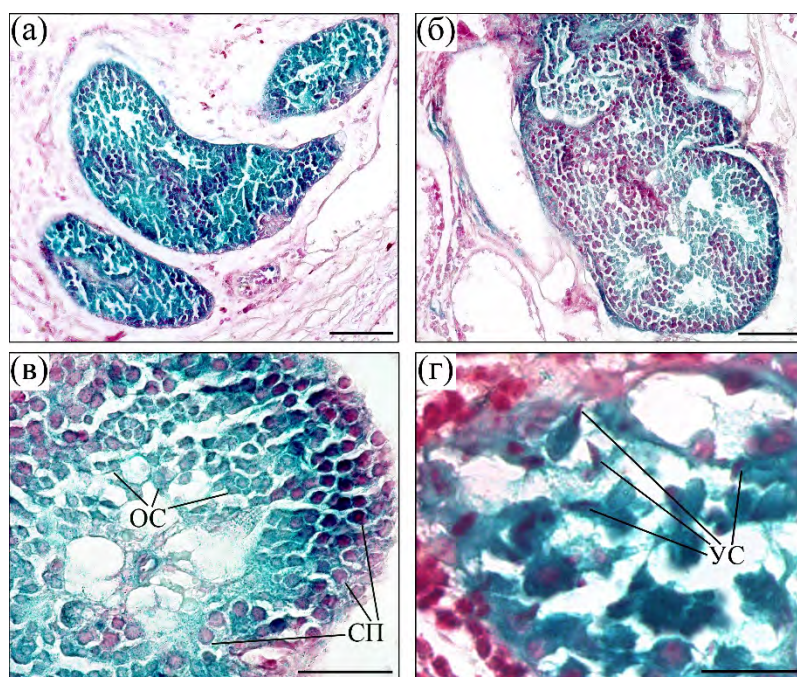


Рис. 1. Трансплантации ССК и КС в семенники мышей, поврежденные в ходе герпесвирусной инфекции. НК в канальцах (А) и в интерстиции (Б) реципиента, сперматогенный эпителий в них (В, Г). ОС – округлые, УС – удлиняющиеся сперматиды, СП – сперматоциты. Гистохимическая окраска на продукт гена LacZ (синий) позволила идентифицировать клетки доноров, полученные от LacZ⁺ трансгенных мышей (ROSA 26); срезы докрашены нейтральным красным. Масштаб: 100 мкм для (А, Б), 50 мкм для (В), 10 мкм для (Г).

Эффективность использования клеточных технологий для восстановления сперматогенеза была также оценена на модели двустороннего абдоминального крипторхизма у крыс,

имитирующего крипторхизм у человека (неопущение одного или двух яичек в мошонку), приводящий к развитию бесплодия. Хирургическая операция орхипексии (опущение яичка в мошонку) – самый распространенный метод лечения крипторхизма, часто не дает ожидаемого восстановления фертильности, что связывают с необратимым нарушением микроокружения ССК, главным образом, КС. В настоящем проекте одновременно с орхипексией в интерстиций семенника трансплантировали КС, полученные от неонатальных крыс. Через 1 мес и 3 мес после трансплантации средний вес семенников реципиентов составлял, соответственно, 522 и 528 мг, что достоверно выше, чем в контроле (421 и 392 мг соответственно). В контроле полностью отсутствовала продукция сперматозоидов, развитие половых клеток было блокировано на сперматогониальной стадии или стадии мейоза (рис. 2А, Б), причем дегенеративные изменения прогрессировали со временем. В то же время после трансплантации КС в части семенных канальцев наблюдалась полная дифференцировка половых клеток вплоть до появления удлиняющихся сперматид (рис. 2В, Г). Половые клетки разных генераций в таких канальцах располагались концентрическими слоями, их число и положение в слоях соответствовало норме. Доля канальцев с нормальной структурой сперматогенного эпителия, содержащих все типы развивающихся половых клеток, через 1 и 3 мес после трансплантации КС в среднем составила, соответственно, 33.7 и 37.5%, в то время как у контрольных животных этот показатель составлял всего 2% на 1 мес и 0.3% на 3 мес. Очевидный эффект внутриинтерстициального введения КС связан, по всей видимости, с паракринным влиянием этих клеток на поврежденные КС реципиента, приводящим к восстановлению их способности поддержания дифференцировки ССК. Таким образом, результаты, полученные на двух моделях мужского бесплодия, свидетельствуют об эффективности использования трансплантаций ССК и клеток их микроокружения для терапии различных патологий яичек.

С помощью метода ПЦР в реальном времени был проанализирован транскриптом КС, полученных от неонатальных, половозрелых мышей, а также КС половозрелых мышей, культивировавшихся в течение 14 сут при разных температурах (34 и 37°C) и разном уровне кислорода (5 и 21%). Установлено, что культивируемые КС сохраняют экспрессию основных генов-маркеров КС: *Gata4*, *Wt1*, *Sf1* и *Sox9*, за исключением *Dmrt1* (рис. 3А-Д). О высокой пролиферативной активности этих клеток свидетельствуют повышенная экспрессия транскрипционных факторов ID1 (рис. 3Е) и ID2 и высокий, как у КС неонатальных мышей, уровень экспрессии циклина D2 (рис. 3Ж). По ряду генов, экспрессия которых изменяется в ходе дифференцировки: гены андрогенового рецептора AR (рис. 3З), *Gdnf*, белка ретинобластомы *Rb1* и др., – культивируемые КС занимают промежуточное положение между КС неонатальных и

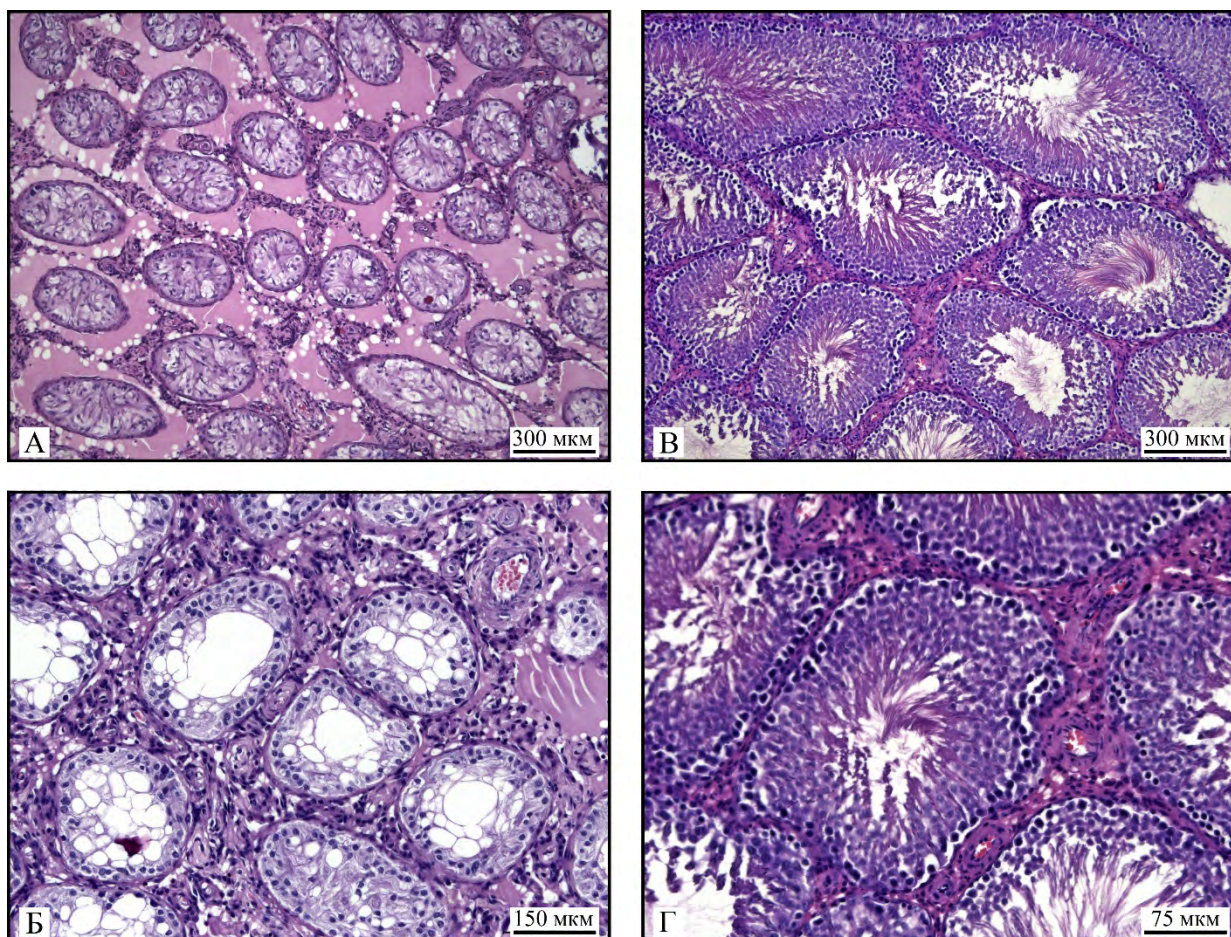


Рис. 2. Гистологические срезы семенников контрольных крипторхидных крыс после орхипексии (А, В) и крыс, которым вместе с орхипексией трансплантировали донорские КС (в, г). Окраска гематиксалин-эозин.

половозрелых животных. Иммунофлуоресцентная окраска на некоторые маркеры КС (рис. 3И-Н) подтверждает результаты ПЦР. При анализе данных ПЦР по всем изученным генам установлено, что КС, культивируемые при 34°C в условиях пониженного содержания кислорода, наиболее полно соответствуют неонатальным клеткам, т.е. клеткам, обладающим высоким регенеративным потенциалом; однако необходимо дальнейшее усовершенствование условий культивирования для более полного сохранения экспрессии таких важных для функционирования микроокружения ССК генов, как *Dmrt1* и *Gdnf*, а также для возможности более длительного культивирования этих клеток.

На первом этапе проекта была проведена апробация технологии трансплантации ССК и клеток их микроокружения, полученных от неонатальных животных, для восстановления сперматогенеза на моделях его повреждения, имитирующих патологии яичек человека. Положительный результат трансплантаций свидетельствует об эффективности этого подхода и позволяет перейти к следующему этапу, на котором будет усовершенствована методика культивирования клеток микроокружения ССК (КС), что необходимо для получения стабильного

источника этих клеток для трансплантаций (эффективные методики получения и культивирования ССК уже имеются и описаны в литературе).

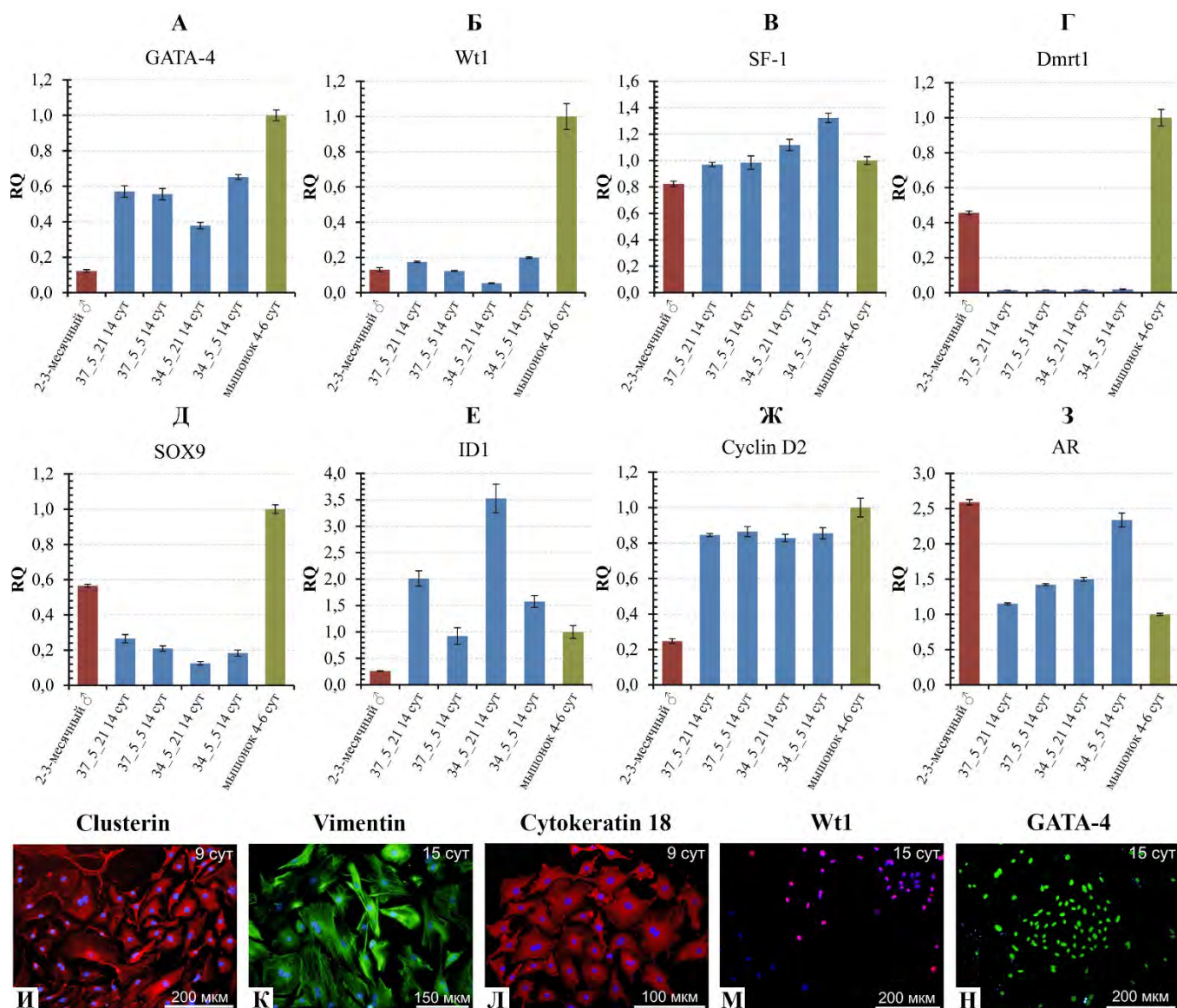


Рис. 3. Результаты ПЦР РВ для генов-маркеров КС (А-З). Данные ПЦР-анализа нормированы по housekeeping гену *Hprt*; за единицу принята экспрессия в КС, полученных от неонатальных мышей. Исследованы КС, культивирующиеся при 37°C, 5% CO₂ и 21% O₂ (37_5_21); при 37°C и 5% O₂ (37_5_5); при 34°C и 21% O₂ (34_5_21) и при 34°C и 5% O₂ (34_5_5). Иммунофлуоресцентная окраска культуры КС на некоторые маркеры КС (И-Н).

РАЗДЕЛ 3. УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ МЕТОДИКИ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КС, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НЕОНАТАЛЬНЫХ И ВЗРОСЛЫХ МЫШЕЙ И ОЦЕНКА МОРФОГЕНЕТИЧЕСКОГО ПОТЕНЦИАЛА КУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК В УСЛОВИЯХ 3D-КУЛЬТУРЫ

Способность КС формировать семенные каналцы – важное условие нормального развития сперматогенной ткани и ее восстановления после повреждений. Неизвестно, сохраняется ли эта

способность в ходе культивирования КС, необходимого для их использования в клеточной терапии.

Для размножения КС, выделенных из семенников 2-4 сут мышат, в прикрепленной культуре при температуре 34°C в газовой среде 5% CO₂ и 5% O₂ были выбраны 3 различных по составу среды:

1. Среда, содержащая 10% FBS (фетальная бычья сыворотка), а также пируват натрия, глутамакс, пенициллин/стрептомицин (входили в состав всех сред и далее не упоминаются).
2. Среда, содержащая 10% KSR (коммерческая бессывороточная добавка), а также концентрат липидов (1:100).
3. Среда, содержащая 1% BSA (бычий сывороточный альбумин, V фракция), а также концентрат липидов, незаменимые аминокислоты и инсулин-трансферрин-селенит.

Анализ концентрации КС в 3 вариантах первичной культуры на 1 и 6 сут показал, что первоначальная концентрация КС во всех культурах была одинаковой и составляла ~22%, к 6 сут для КС в бессывороточных культурах увеличивалась до 87%, тогда как в культуре с 10% FBS только до 39%. Исследование пролиферативного потенциала культивируемых клеток показало, что только в культурах, содержащих 10% KSR, клетки сохраняют способность к размножению в течение 3-4 пассажей до 15 сут культивирования. Анализ экспрессии основных маркеров КС в 4 вариантах культуры методом ПЦР-РВ на 3 сут культуры показал наиболее значительное их снижение в культуре с 10% FBS, в то время как показатели экспрессии в культуре с KSR фактически не отличались от таковых в КС из семенников мышонка.

Для анализа морфогенетических способностей КС неонатальных животных, размноженных в условиях культуры, клетки помещали в коллагеновый гель и культивировали на разделе фаз газ/жидкость при 34°C и пониженном содержании кислорода (5%), т.е. в условиях, максимально приближенных к тем, что имеются в семенниках. КС из исследуемых культур помещали в гель совместно с перитубулярными-мышечными клетками (в соотношении 7:5 КС:ПМК), также необходимыми для морфогенеза канальцев (условия культивирования ПМК хорошо описаны в литературе и были одинаковыми во всех экспериментах: среда с 10% FBS 37°C и 21% кислорода). КС из 4 вариантов культуры помещали в гель на 3, 6, 9, 12 и 15 сут (последние 2 срока только для культуры с KSR-добавкой). Через 7 сут анализировали результаты культивирования.

Было установлено, что в культуре с 10% FBS уже после 3 сут размножения в прикрепленной культуре только малая доля КС сохраняет способность к формированию единичных канальцев (рис. 4а), а после 6 сут эта способность полностью утрачивается и клетки располагаются в геле беспорядочно (рис. 4б). В среде с 1% BSA способность формировать канальцы *in vitro* сохраняется до 6 сут (рис. 4в-г). Наилучшие результаты были получены на среде с 10% KSR, здесь после 6 сут размножения в прикрепленной культуре и помещения в гель клетки формировали протяженные канальцевые структуры, окруженные со всех сторон ПМК (рис 4д), с хорошо видимым на

поперечном срезе просветом (рис. 4Е, Ж). Только в условиях культивирования в KSR-среде способность формировать каналцы сохранялась на протяжении 12 сут предварительного 2D-культивирования (рис. 4З, И). Анализ экспрессии основных маркеров КС, помещенных в гель из 6 сут культур, показал, что их экспрессия наиболее значительно возрастает там, где клетки предварительно культивировали на KSR-среде.

Далее нами было проведено культивирование КС половозрелых животных, которые являются более предпочтительным источником клеток для трансплантации. КС, полученные из семенников половозрелых животных, размножали перед помещением в гель в среде с низким содержанием сыворотки (1%) в условиях 34°C в газовой среде 5% CO₂ и 5% O₂ (34_5) и 37°C в газовой среде 5% CO₂ и 21% O₂ (37_21) (условия культивирования были выбраны, основываясь на результатах работ, выполненных в 2014 г). В начале КС для культивирования получали из цельных семенников половозрелых животных. При обоих условиях в процессе культивирования КС формировали колонии, что подтверждается окраской на их маркер Wt1 (рис. 5А1 и А2). Однако мы обнаружили, что в культуре наряду с активно пролиферирующими КС, формирующими колонии, присутствуют отдельно лежащие не пролиферирующие КС. Клетки в колониях имели морфологию ядра, схожую с таковой у недифференцированных КС мышонка (КС с измененной формой ядра – много гетерохроматиновых глыбок в ядре – рис. 5А, увеличенная вставка 1), в то время как отдельно лежащие КС имели морфологию ядра, близкую к дифференцированным КС взрослых животных (КС с обычной морфологией ядра – более крупное ядро, содержащее 2 гетерохроматиновые глыбки – рис. 5А, увеличенная вставка 2). Дальнейшие исследования показали, что КС с измененной морфологией ядра не образуются в культуре из КС с обычной морфологией, а уже присутствуют в ней с 1 сут культивирования. Мы предположили, а затем и обнаружили, что эти 2 различных по морфологии и пролиферативному потенциалу типа КС расположены в семенниках в различных участках семенных каналцев. Так КС с типичной для дифференцированных клеток морфологией ядра расположены в извитых семенных каналцах, где происходит развитие половых клеток, тогда как КС с измененной морфологией расположены в концевых отделах каналцев (в т.н. переходной зоне), где развитие половых клеток уже не наблюдается. В количественном отношении доля КС с модифицированной морфологией в семенниках намного ниже, чем с обычной, но их пролиферативный потенциал в культуре значительно больше. Это подтвердилось результатами раздельного культивирования КС, полученных из извитых каналцев, и КС, полученных из переходной зоны. В первом случае мы не

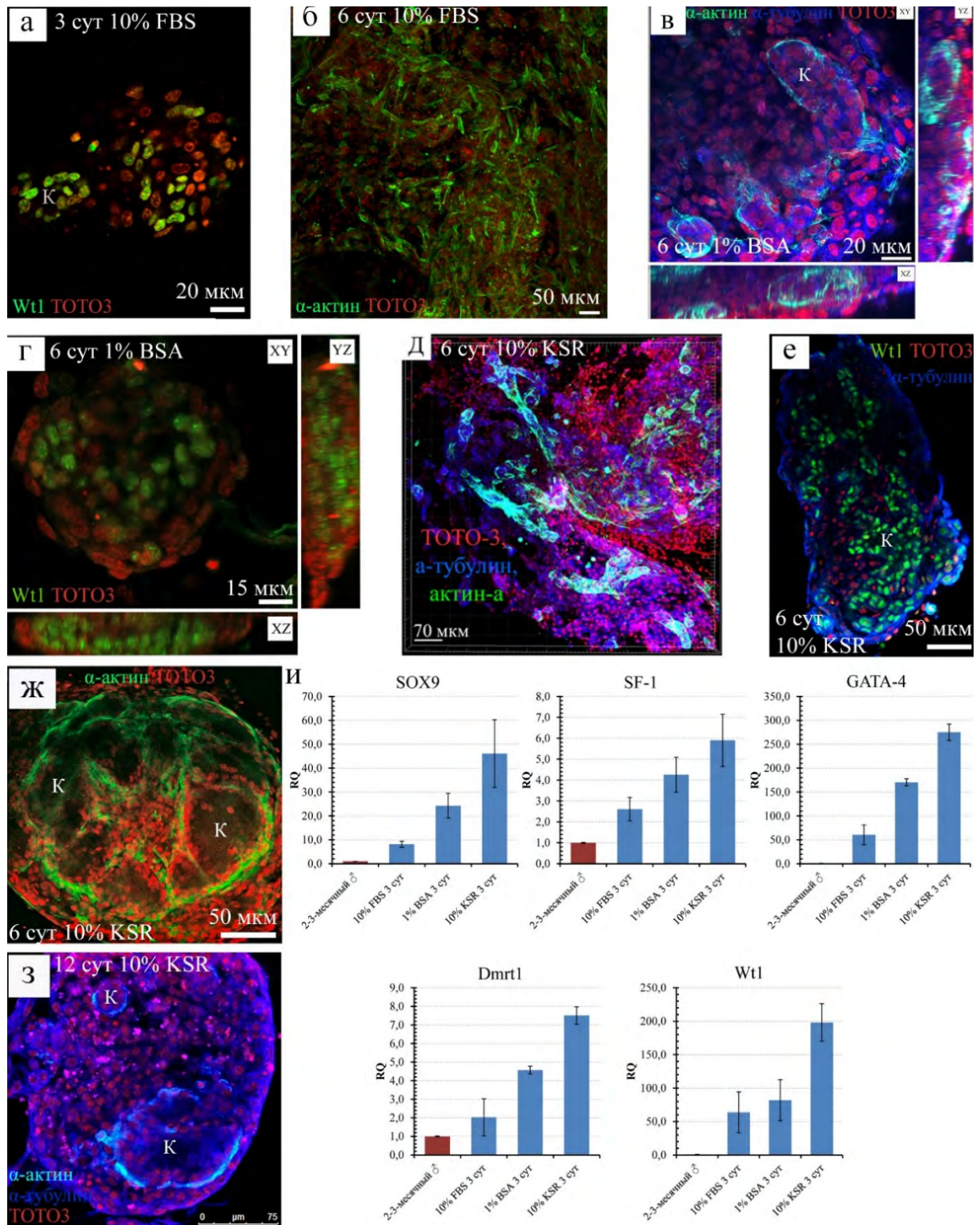


Рис. 4. Коллагеновые гели на 7 сут 3D-культивирования, содержащие клетки из 3-12-суточных культур: КС на среде с 10% FBS – а, б, КС на среде с 1% BSA – в, г, КС на среде с 10% KSR – д-з и ПМК на среде 10% FBS. з – результаты ПЦР-РВ анализа экспрессии маркеров КС, КС из различных вариантов культуры, помещенных в коллагеновый гель (после 7 сут 3D-культивирования). а, б, е, ж, з – максимальные проекции с Z-серии конфокальных снимков; в, г – ортогональные проекции с Z-серией конф. снимков. К – канальцевые структуры.

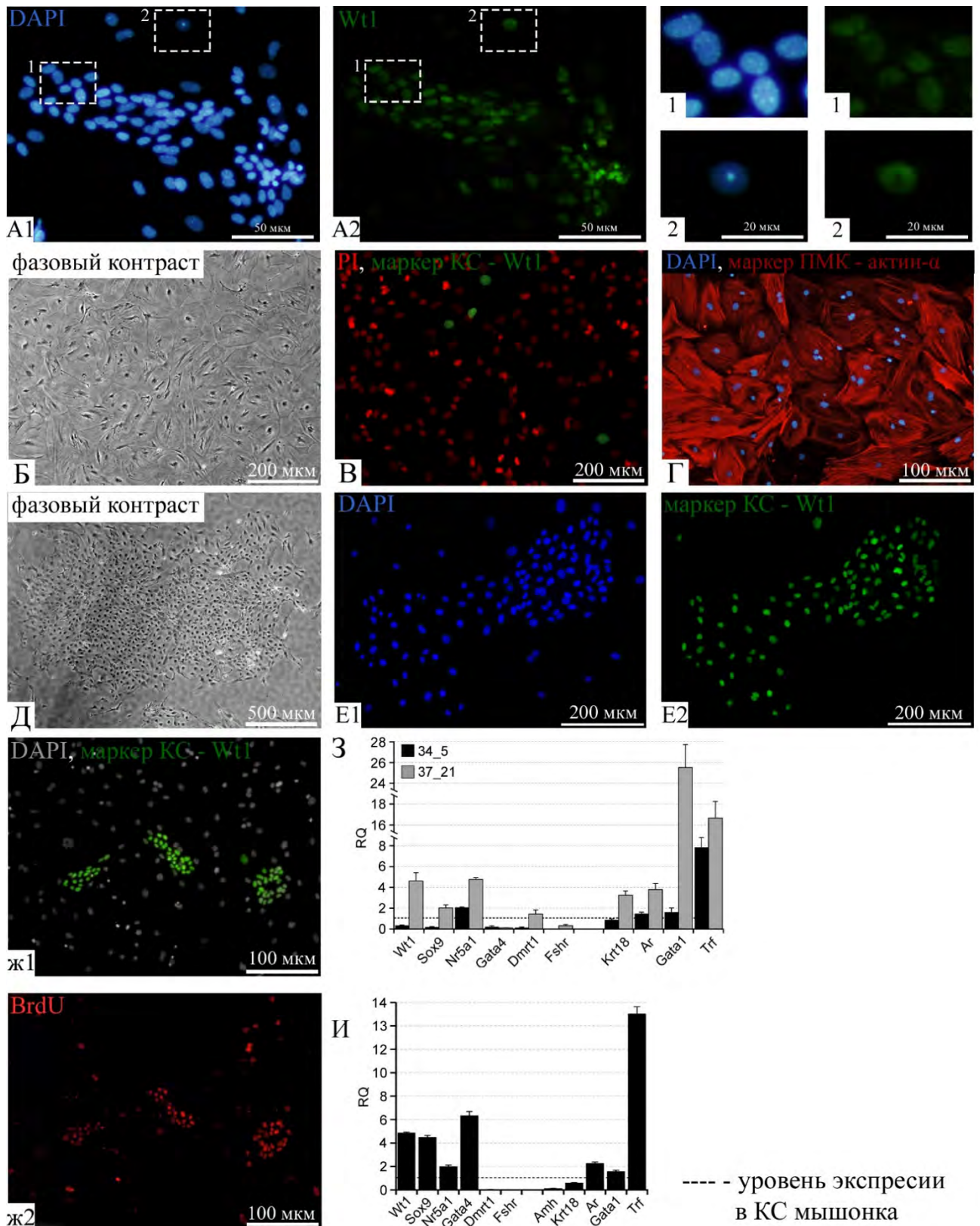


Рис. 5. Культура КС половозрелой мыши. А1, А2 – часть Wt1-положительных КС с измененной морфологией ядра формирует колонии в культуре, часть, с неизменной морфологией, располагается в виде отдельных клеток. Б – внешний вид культуры КС семенных канальцев (нет колоний). В – окраска культуры семенных канальцев на Wt1, Г – на актин-α. Д – внешний вид культуры КС прямых канальцев – переходной зоны между семенными канальцами и сетью семенника (есть колонии). Е1, Е2 – окраска культуры прямых канальцев на Wt1. Ж1, Ж2 – двойная окраска культуры прямых канальцев на Wt1 и BrdU. 3 – уровень экспрессии основных маркеров КС клетками переходной зоны на 10 сут культивирования в культурах 34_5 и 37_21, И - уровни экспрессии этих же маркеров в культуре 37_21 на 2 пассаже 24 сут.

наблюдали образования колоний (рис. 5Б, В) и доля КС в культуре постепенно снижалась из-за разрастания ПМК (рис. 5Г, окрашены на а-актин). В культуре, полученной из концевых отделов, мы наблюдали формирование больших колоний (рис. 5Д), окрашивающихся на Wt1 (рис. 5Е), а доля КС в культурах 34_5 и 37_21 достигала, соответственно, $50,1 \pm 5,8$ и $80 \pm 2,8\%$. Wt1⁺-клетки включали BrdU-метку (рис. 5Е). Анализ экспрессии культивируемыми КС основных маркеров показал, что их экспрессия выше в культуре 37_21, чем 34_5 и сохраняется в ней на 2 пассаже после 24 сут культивирования (рис. 5З-И). Помещение КС, выращенных в обоих типах культуры, в коллагеновый гель после 10 сут культивирования показало, что КС взрослых животных также способны формировать каналцевые структуры *de novo*, как и КС неонатальных животных (рис. 6).

Полученные результаты показывают, что не только КС неонатальных животных способны пролиферировать в культуре и образовывать каналцы при помещении в коллагеновый гель, но, и что более важно для будущего терапевтического использования, в семенниках половозрелых животных есть небольшая популяция активно пролиферирующих клеток с сопоставимыми морфогенетическими способностями.

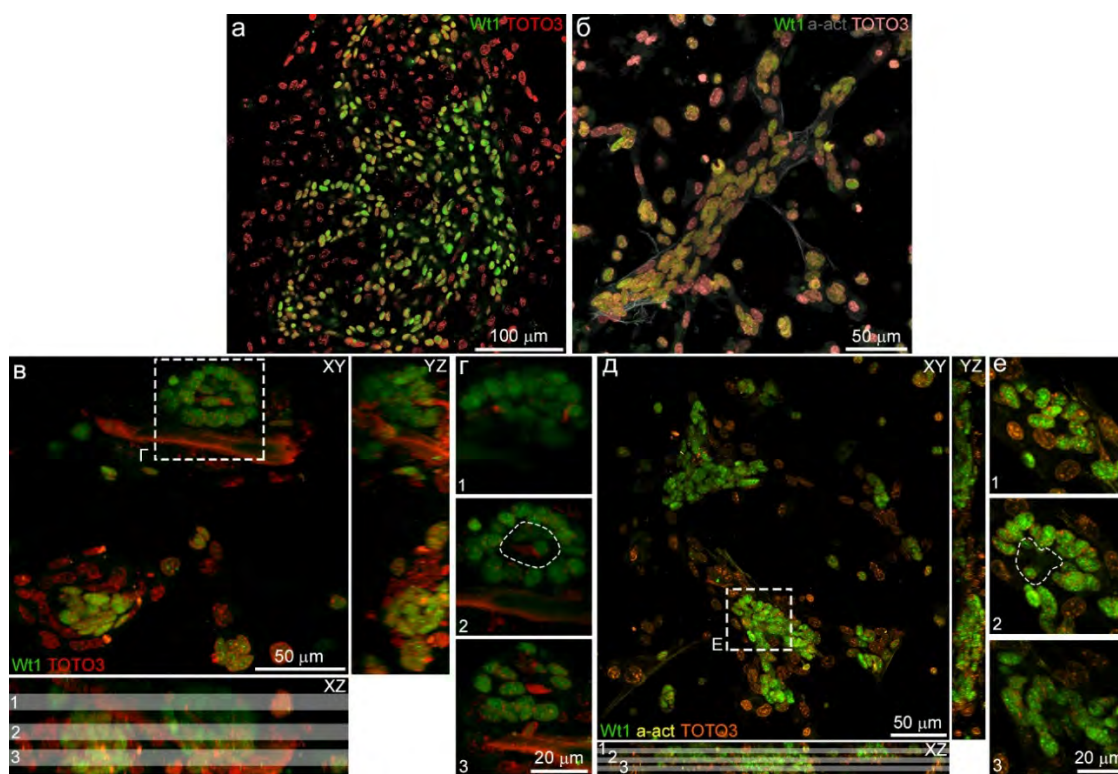


Рис. 6. Коллагеновые гели на 7 сут 3D-культивирования, содержащие КС половозрелых мышей культивированных в течение 10-сут на среде с 1% FBS и ПМК культивированные на среде 10% FBS.
 а, в, г - культура КС 34_5; б, д, е - культура КС 37_21.
 а, б, - максимальные проекции с Z-серии конфокальных снимков;
 в, г - ортогональные проекции с Z-серий конфокальных снимков.
 г, е - максимальные проекции сделанные с различных участков Z-серии в и д, соответственно (расположение указано цифрами, пунктир - просвет в каналце).

РАЗДЕЛ 4. ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧИЙ МЕЖДУ ДВУМЯ ПОПУЛЯЦИЯМИ КС ИЗ СЕМЕННИКОВ ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ И ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ КУЛЬТУРЫ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ПРОЛИФЕРАЦИИ КС И СОХРАНЕНИЯ ИМИ СВОИХ МОРФОГЕНЕТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Для определения различий между популяцией КС извитых семенных канальцев – ST КС, и КС из переходной зоны семенников (располагается на границе извитых семенных канальцев и начального отдела семявыводящих путей, сети семенника) – TZ КС, было проведено их отдельное культивирование и последующий иммунофлуоресцентный и ПЦР РВ анализы. Установлено, что обе популяции КС экспрессируют один из основных маркеров КС Sox9 (рис. 7А, 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. 7В, Д). В то время как ST КС никогда не окрашиваются на Krt8/18 (рис. 7В, стрелки) и всегда окрашиваются на Dmrt1 (рис. 7Г). 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. 7Е, Ж), причем его экспрессия появляется и растет с появлением и разрастанием колоний TZ КС. Acta2 часто оказывается маркером эпителио-мезенхимального перехода (ЭМП), поэтому, для дальнейшего изучения этого явления, нами было проведено измерение экспрессии других генов-маркеров ЭМП: Snai1 и Twist1. Оказалось, что оба эти гена находятся в культуре TZ КС на низком уровне (рис. 7И). 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 ЭМП, можно объяснить недифференцированным 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*.

С целью оптимизации условий культуры TZ КС 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 КС можно ко 2 пассажу, когда

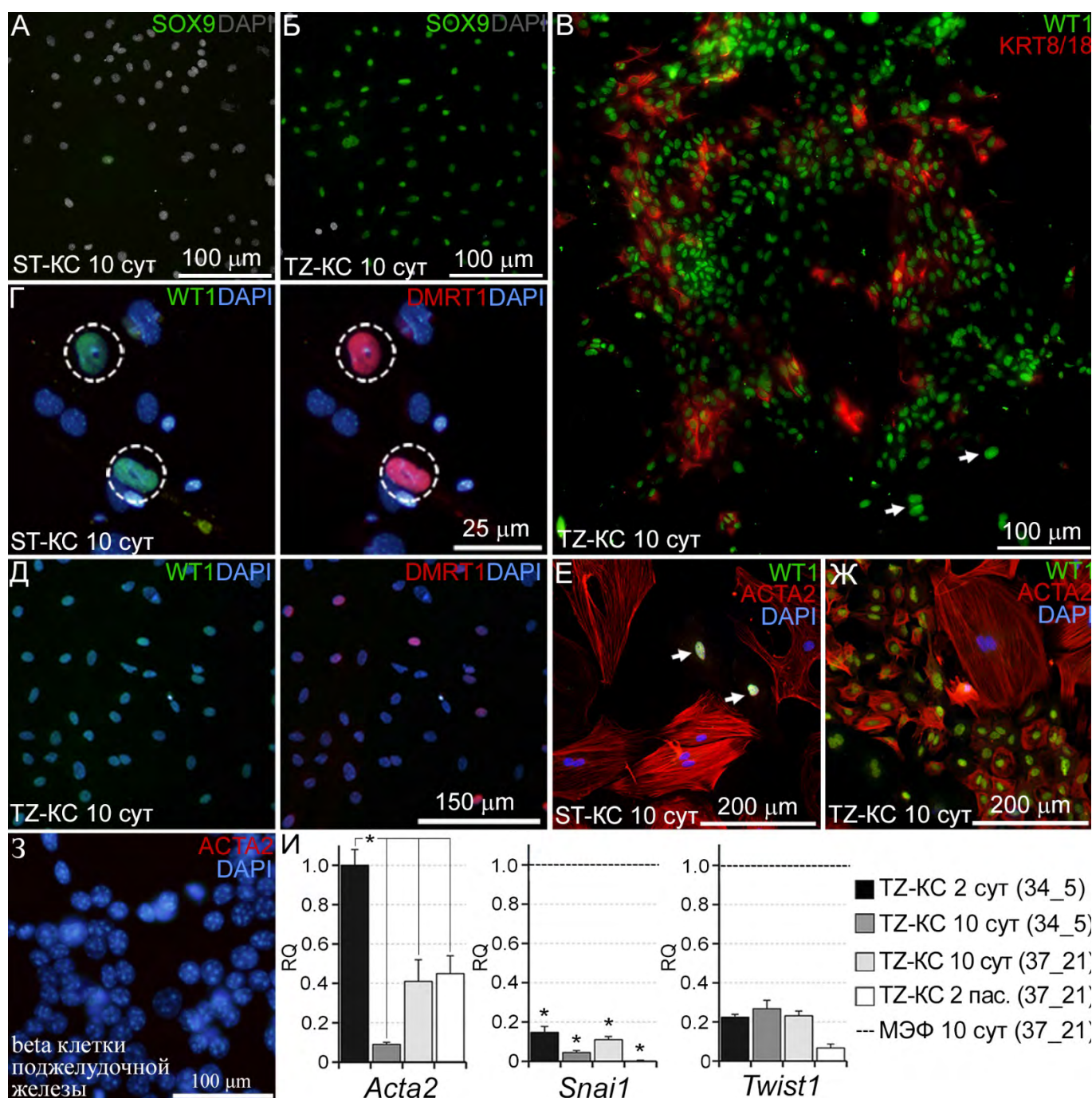


Рис. 7. Характеристика культур ST и TZ КС. Иммунофлуоресцентная окраска на Sox9 (А, Б), Wt1 и Krt8/18 (В), Wt1 и Dmrt1 (Г, Д), Wt1 и Acta2 (Е, Ж); контроль для Acta2 (З). Стрелки – примесные ST КС в культуре TZ КС; пунктиром обведены КС. ПЦР РВ анализ экспрессии Acta2 и факторов MET в культурах TZ КС (И).

доля Wt1+ клеток (Wt1 – маркер КС, экспрессия которого в TZ КС была изучена на предыдущем этапе проекта) равнялась 93-95% (рис. 8А). Далее было продемонстрировано, что покрытие культуральных планшетов Матригелем значительно увеличивает не только степень прикрепления,

но и пролиферативную активность TZ КС (рис. 8Б, 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. 8Г), с 1% FBS плюс LIF и EGF (рис. 8Д), с 1% FBS плюс LIF и IGF (рис. 8Е), с 1% FBS плюс LIF, IGF и EGF (рис. 8Ж). 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*.

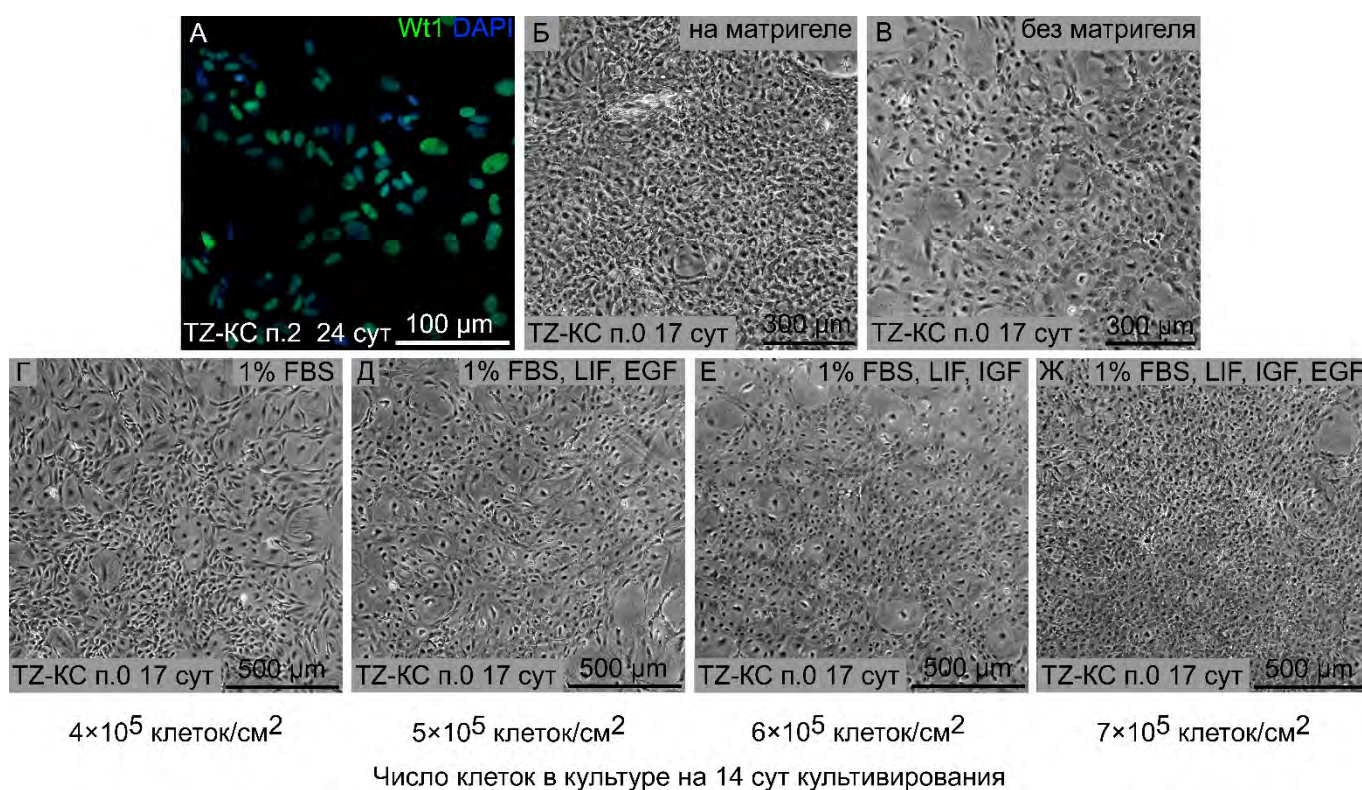


Рис. 8. Оптимизация культуры TZ КС. Экспрессия *Wt1* на 2 пассаже (А). Культура TZ КС на культуральных планшетах, покрытых (Б) и не покрытых матригелем (В). Культура TZ КС, выращенная на среде с добавлением разных сочетаний ростовых факторов (Г-Ж).

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 канальцев 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. 9А, Б). В стенке сформировавшихся канальцев присутствовали как единичные TZ КС, так и целые группы этих клеток (рис. 9Г, Д). Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание культур на *Wt1* и *Dmrt1* показало, что бóльшая часть $GFP^+/Wt1^+$ клеток экспрессировала *Dmrt1* (рис. 9Е, 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. 9В). Полученные данные убедительно свидетельствуют о функциональности TZ КС и их способности к дифференцировке в 3D условиях, максимально приближенных к *in vivo* условиям.

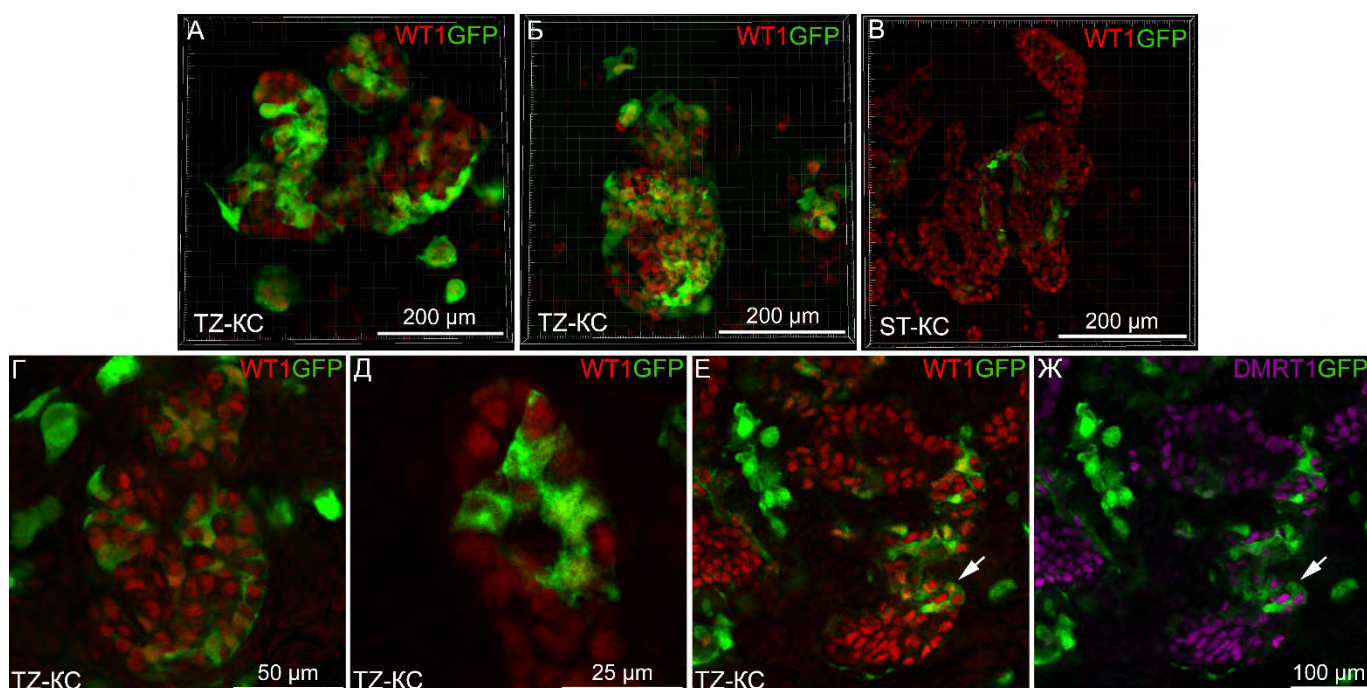


Рис. 9. Совместные культуры GFP^+ TZ КС и клеток семенника мышонка, конфокальная микроскопия. Иммунофлуоресцентная окраска на *Wt1* (А, Б, Г, Д); в качестве контроля представлена совместная культура клеток мышонка с ST КС (В). Иммунофлуоресцентная окраска на *Wt1* и *Dmrt1* (Е, Ж), стрелка – единичная $Dmrt1^-$ TZ КС.

Таким образом, полученные результаты показывают, что популяция клеток, выделенных из переходной, транзитной зоны семенника половозрелой мыши, является источником недифференцированных КС, которые можно поддерживать и размножить в культуре, и которые, при помещении в соответствующие условия, способны дифференцироваться и формировать

семенные каналцы. Для оценки способности этих клеток поддерживать полноценный сперматогенный процесс необходимы дальнейшие исследования.

РАЗДЕЛ 5. ИЗУЧЕНИЕ СПОСОБНОСТИ TZ КС, ВЫРАЩЕННЫХ В КУЛЬТУРЕ, ПОДДЕРЖИВАТЬ РАЗВИТИЕ ПОЛОВЫХ КЛЕТОК

Для проверки способности КС, полученных из переходной зоны семенных каналцев семенников половозрелых мышей (TZ КС) и активно пролиферирующих в культуре (как было установлено на предыдущих этапах проекта), поддерживать развитие мужских половых клеток TZ КС кокультивировали совместно с половыми клетками в 2D условиях. Для этого на монослой TZ КС наслаивали суспензию клеток из семенников неонатальных мышей, содержащую ССК, и культивировали в течение 7 сут. В качестве отрицательного контроля использовали культуру КС извитых семенных каналцев половозрелых мышей, не способных к активной пролиферации, в качестве положительного контроля – культуру КС неонатальных мышей, недифференцированных и пролиферирующих в культуре. По результатам иммунофлуоресцентного анализа, во всех 2D-кокультурах присутствовали только единичные половые клетки, положительно окрашивающиеся на маркер половых клеток DDX4 и маркер сперматогониальных клеток Dmrt1. Был сделан вывод о непригодности данной системы культивирования для развития половых клеток.

В качестве замены была использована методика 3D-культивирования в коллагеновом геле, применявшаяся на предыдущем этапе проекта для оценки способности TZ КС формировать семенные каналцы. TZ КС, полученные из семенников GFP-мышей 2–3-месячного возраста и культивировавшиеся в 2D-условиях в течение 5 сут, соединяли с одноклеточной суспензией семенников 4-суточных C57Bl/6-мышей, содержащей половые клетки на этапе сперматогониальных делений, и помещали в коллагеновый гель, который либо культивировали в течение 7-14 сут, либо помещали под капсулу почки мышей-реципиентов. При трансплантации коллагеновых гелей под капсулу почки КС в них либо располагались в виде неструктурированной массы клеток, либо формировали каналцеподобные структуры, как правило, без половых клеток. Рядом с трансплантированными клетками находились скопления иммунных клеток реципиента. По-видимому, именно значительная воспалительная реакция привела к гибели большей части половых клеток в трансплантатах.

Лучшие результаты были получены при культивировании коллагеновых гелей на границе фаз газ/жидкость в среде, содержащей 10% заменителя сыворотки KSR. Анализ 3D-кокультур проводили с помощью иммунофлуоресцентного метода и конфокальной микроскопии, гели окрашивали на GFP, маркер КС Sox9, маркер дифференцированных КС и сперматогониальных

половых клеток *Dmrt1* и маркер половых клеток на любой стадии *DDX4*. Установили, что на 7 сут культивирования в 3D-культуре $GFP^+/Sox9^+$ клетки, т.е. TZ КС взрослых животных, формируют

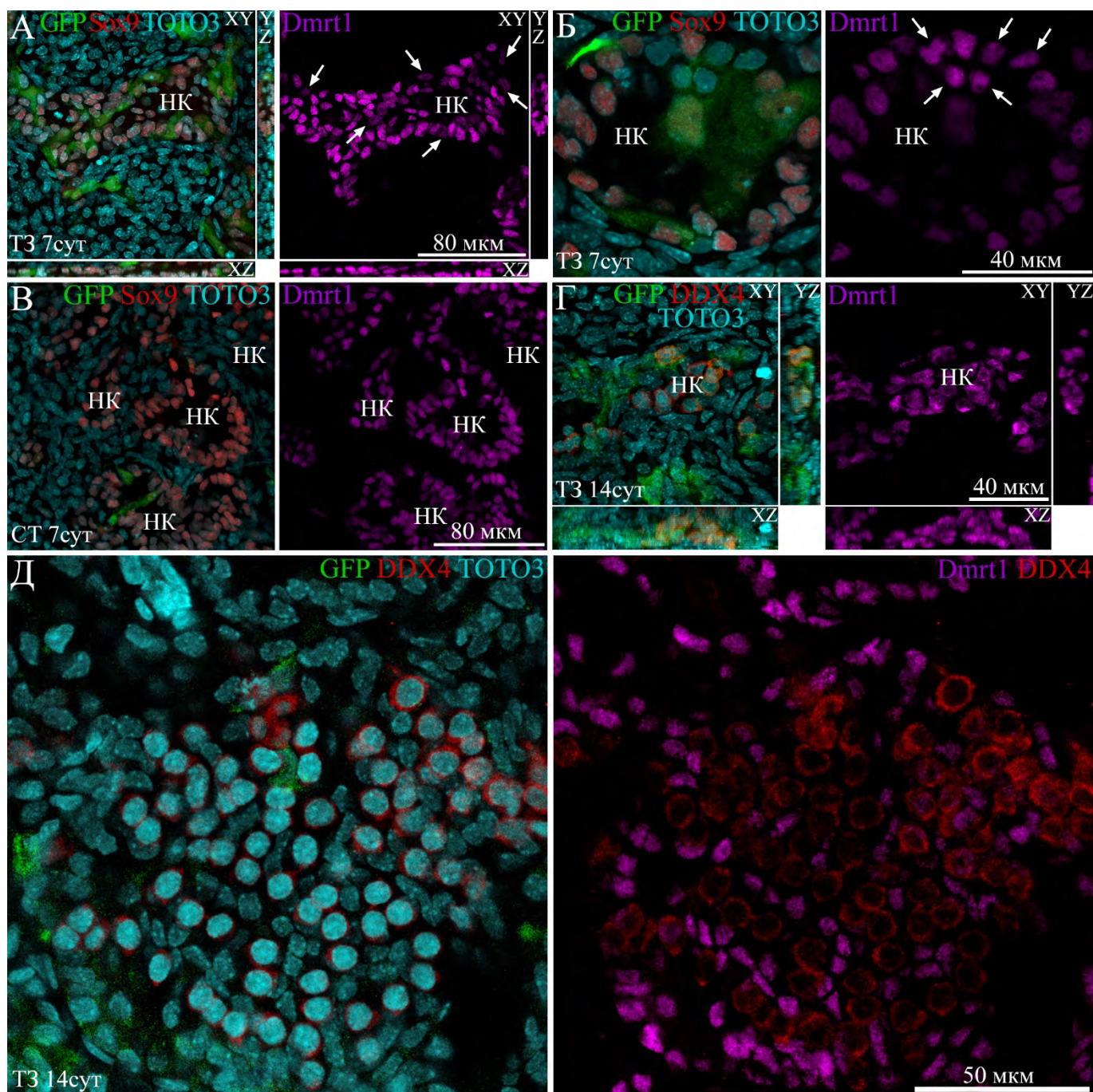


Рис. 10. 3D-культура GFP^+ КС TZ и GFP^- клеток семенника 4-суточных мышат. Иммунофлюоресцентная окраска на *GFP*, *Sox9* и *Dmrt1* (A–B) и на *GFP*, *DDX4* и *Dmrt1* (Г, Д), конфокальная микроскопия. Представлены максимальные проекции, полученные с Z-серии конфокальных снимков; А, Г – дополнительно представлены ортогональные проекции с Z-серии снимков; НК – новообразованный каналец. Стрелки – GFP^+ -TZ КС, слабо экспрессирующие *Dmrt1* (А), $Dmrt1^+/Sox9^-$ – сперматогонимальные половые клетки, (Б) $DDX4^+/Dmrt1^+$ – сперматогонимальные клетки (Г).

канальцеподобные структуры (рис. 10А). Часть этих клеток слабо экспрессировала *Dmrt1*, то есть находилась в недифференцированном состоянии. В канальцах, в окружении $Sox9^+/Dmrt1^+$ КС, встречались также группы $Sox9^-/Dmrt1^+$ клеток, т.е. сперматогониальных половых клеток (рис. 10Б). В контрольных кокультурах, где с клетками мышонка смешивали дифференцированные GFP^+ КС, полученные из извитых семенных канальцев, канальцы формировались за счет GFP^+ КС неонатальных мышей, КС взрослых животных встречались только в единичных случаях (рис. 10В). На 14-е сутки 3D-культуры количество половых клеток увеличивалось. $DDX4^+$ половые клетки формировали кластеры внутри семенных канальцев, сформированных GFP^+ TZ КС и КС мышонка (рис. 10Г). Часть половых клеток в кластерах прекращала экспрессию *Dmrt1*, т.е. дифференцировалась. Судя по размерам клеток, структуре ядра и их расположению у базальной мембраны канальца, эти половые клетки находились на стадии мейотических делений (рис. 10Д).

РАЗДЕЛ 6. СОПОСТАВЛЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ С МИРОВЫМ УРОВНЕМ

В последнее время активно обсуждаются методы клеточной терапии мужского бесплодия. Уже существуют методики, позволяющие культивировать ССК человека, разработана технология получения ССК из эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток [9]. На экспериментальных животных показана безопасность трансплантации ССК в семенники, отсутствие эпигенетических нарушений в образующихся из них гаметах, получены нормально развивающиеся эмбрионы [15-17]. На аутопсийном материале отработан метод введения клеток в семенные канальцы яичка человека [18, 19]. Однако большинство патологий яичек человека связано не только с повреждением ССК, но и с нарушением их микроокружения, КС. На моделях химического и радиационного нарушения микроокружения ССК [3, 4] установлено, что трансплантации недифференцированных КС неонатальных животных способны восстанавливать сперматогенную ткань (семенные канальцы) и сперматогенез. Однако до недавнего времени было неизвестно, применим ли этот подход для реальных патологий человека, которые вызывают более широкий спектр повреждений. В настоящем проекте возможность применения данного подхода для патологий яичек человека была подтверждена на моделях, имитирующих орхит вирусной этиологии и крипторхизм.

Для проведения аутологичных трансплантаций клетки микроокружения ССК необходимо получать из ткани взрослого организма, но, по литературным данным [3], дифференцированные КС не обладают регенерационными свойствами, необходимыми для эффективных трансплантаций. Однако было показано, что эти клетки могут дедифференцироваться и пролиферировать при выведении в культуру [10, 11]. Нами в данном проекте было установлено,

что КС действительно начинают активно пролиферировать в культуре, но такими свойствами обладает только небольшая популяция КС в транзитной зоне семенника (TZ КС). Проведенное нами исследование TZ КС *in vivo* и *in vitro* позволило выявить отличительные черты данной популяции клеток, такие как пониженная экспрессия *Dmrt1*, что свидетельствует о недифференцированном статусе клеток [27]. Также было установлено, что TZ КС способны принимать участие в формировании семенных канальцев и поддерживать в них развитие половых клеток, подобные свойства ранее были описаны только для недифференцированных КС неонатальных организмов [28].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы над проектом впервые на моделях, имитирующих патологии человека, приводящие к развитию мужского бесплодия, продемонстрировано, что трансплантация клеток микроокружения (КС), совместно со стволовыми сперматогониальными клетками (ССК), приводит к частичному восстановлению структуры ткани семенника и дифференцировке половых клеток вплоть до постмейотических стадий. Показано, что данная методика может быть использована для терапии мужского бесплодия в случае нахождения оптимального источника КС во взрослом организме. Дальнейшие этапы проекта были посвящены поиску такого источника клеток и разработке методов культивирования КС в культуре. Впервые показано, что в семенниках половозрелых млекопитающих присутствуют в небольшом количестве недифференцированные КС, способные к активной пролиферации в культуре (КС транзитной зоны семенника, TZ КС), что заставляет пересмотреть представления о дифференцировке и регенеративном потенциале КС. Разработана методика культивирования TZ КС, позволяющая существенно увеличить их количество в культуре. Продemonстрировано, что в условиях 3D-культуры TZ КС способны формировать семенные канальцы и поддерживать в них развитие половых клеток, по крайней мере, до мейотических стадий, так же, как это делают недифференцированные КС неонатальных животных. Таким образом, найден источник КС во взрослом организме, который может быть использован для терапии тех случаев мужского бесплодия, когда повреждено микроокружение ССК и развитие половых клеток заблокировано.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. European Association of Urology (2010) Guidelines on Male Infertility. <http://www.uroweb.org>
2. Aponte et al. (2013) Clinics (Sao Paulo). V. 68. Suppl. 1. P. 157-167.
3. Shinohara et al. (2003) Biol. Reprod. V. 68(3). P. 1064-1071.
4. Zhang et al. (2009) Reproduction. V. 137(3). P. 497-508.
5. Малолина и др. (2011) Бюл. эксп. биол. и мед. Т. 151. № 5. С. 585-588.
6. Малолина, Кулибин. (2012) Молекулярная медицина. № 4. С. 49-57.
7. Малолина и др. (2013) Урология. № 4. С. 55-59.
8. Malolina et al. (2014) Int. J. Exp. Path. V. 95. P. 120-130.
9. Martin, Seandel. (2013) Biomed. Res. Int. V. 2013. P. 384734.
10. Ahmed et al. (2009) Biol. Reprod. V. 80(6). P. 1084-1091.
11. Chui et al. (2011) Cell Transplant. V. 20(5). P. 619-635.
12. Кулибин, Малолина. (2013) Цитология. Т. 55. № 11. С. 788-797.
13. Skinner, Griswold. (2005) Sertoli Cell Biology. Elsevier Academic Press. 494 p.
14. Buganim et al. (2012). Cell Stem Cell. V. 11(3). P. 373-386.
15. Hermann et al. (2012) Cell Stem Cell. V. 11(5). P. 715-726.
16. Wu et al. (2012) Hum. Reprod. V. 27(5). P. 1249-1259.
17. Lee et al. (2013) PLoS One. V. 8(1). P. e54889.
18. Ning et al. (2012) Fertil. Steril. V. 98(6). P. 1443-1448.
19. Faes et al. (2013) Fertil. Steril. V. 100(4). P. 981-988.
20. Monsees et al. (2000) Andrologia. V. 32(4-5). P. 239-246.
21. Foresta et al. (2001) J. Clin. Endocrinol. Metab. Vol. 86(6). P. 2414-2419.
22. Van Saen et al. (2012) Hum. Reprod. V. 27(2). P. 323-330.
23. Wang et al. (2013) PLoS Genet. V. 9(8). P. e1003645.
24. Kanatsu-Shinohara et al. (2005) Hum. Reprod. V. 20(9). P. 2376-2382.
25. Dobrinski I. (2007) Organogenesis. V. 3(2). P. 79-82.
26. Nistal et al. (2013) Reprod. Toxicol. V. 42. P. 172-179.
27. Raymond et al. (2000) Genes Dev. V. 14. P. 2587-2595.
28. Zhang et al. (2014) Gen Comp Endocrinol. V. 205. P. 121-132.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ РАБОТЫ ЗА ВЕСЬ СРОК ВЫПОЛНЕНИЯ ПРОЕКТА

1. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А., Яцек С.П., Жамынчиев Э.К., Кузин Г.В. Восстановление сперматогенеза после экспериментального двустороннего абдоминального крипторхизма путем аллогенной трансплантации недифференцированных клеток Сертоли. // Урология. 2015. №6. С. 74-81.
2. Malolina E.A., Kulibin A.Yu., Kushch A.A. Neonatal testicular cell transplantation restores murine spermatogenesis damaged in the course of herpes simplex virus-induced orchitis. // *Reproduction, Fertility and Development*. 2016. V.28. №6. P. 757-764.
3. Kulibin A.Yu., Malolina E.A. Only a small population of adult Sertoli cells actively proliferates in culture. // *Reproduction*. 2016. V.152. №4. P. 271-281.
4. Кулибин А.Ю., Малолина Е.А. Характеристика минорной популяции активно пролиферирующих в культуре клеток Сертоли из транзиторной зоны яичка взрослых мышей. // *Молекулярная медицина*. 2017. Том.15. №6. С.28-31.
5. **Малолина Е.А., Кулибин А.Ю.** Изучение области сети семенника и прилегающих к ней семенных канальцев в постэмбриональном развитии мыши // *Онтогенез*. 2017. Т. 48. №6. С. 450-458. DOI: 10.7868/S0475145017060027 (**Malolina E.A., A.Yu. Kulibin.** Rete testis and the adjacent seminiferous tubules during postembryonic development in mice // *Russian Journal of Developmental Biology*. November **2017**, V. 48. Is. 6. P. 385–392. DOI: 10.1134/S1062360417060029). **Индексируется в системе WoS.**
6. Kostarnoy AV, Gancheva PG, Lepenies B, Tukhvatulin AI, Dzharullaeva AS, Polyakov NB, Grumov DA, Egorova DA, Kulibin AY, Bobrov MA, Malolina EA, Zykin PA, Soloviev AI, Riabenko E, Maltseva DV, Sakharov DA, Tonevitsky AG, Verkhovskaya LV, Logunov DY, Naroditsky BS, Gintsburg AL. Receptor Mincle promotes skin allergies and is capable of recognizing cholesterol sulfate // *Proc Natl Acad Sci USA*. **2017**. V. 114. №13. P. E2758-E2765. DOI: 10.1073/pnas.1611665114. **Индексируется в системе WoS.**

Отчет утвержден Ученым советом ИБР РАН 06 декабря 2017 г., протокол № 9.