

КРАТКОЕ  
СООБЩЕНИЕ

УДК 591.3

ПОВЕДЕНИЕ СЕРТОЛИ-ПОДОБНЫХ КЛЕТОК  
ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ В СЕМЕННИК,  
ЛИШЕННЫЙ КЛЕТОК СЕРТОЛИ

© 2022 г. В. В. Мун<sup>а</sup>, \*, А. Ю. Кулибин<sup>б</sup>, Е. А. Малолина<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра эмбриологии,  
ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12, Москва, 119934 Россия

<sup>б</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, ул. Вавилова, 26, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: valeriy2125@gmail.com

Поступила в редакцию 17.06.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 26.09.2022 г.

Поддержание развития мужских половых клеток во многом зависит от целостности популяции клеток Сертоли (КС). Так как с наступлением половой зрелости КС большинства видов млекопитающих теряют способность к пролиферации и восстановлению своей популяции в случае повреждения, поиск альтернативных источников этих клеток пригодных для трансплантации – актуальная задача. Таким источником могут стать Сертоли-подобные клетки (СПК) сети семенника, экспрессирующие многие гены-маркеры КС и способные к пролиферации в культуре. Ранее мы уже показали способность СПК *in vitro* участвовать в образовании канальце-подобных структур при кокультивировании с КС мышонка. В настоящей работе мы протестировали свойства СПК *in vivo*. Для этого были проведены трансплантации СПК, размноженных в культуре, в семенники мышей, обработанные детергентом хлоридом бензалкония (ХБ), который был использован для удаления КС из семенников. Действительно, инъекции ХБ через сеть семенника снижали число КС. Также было продемонстрировано, что трансплантированные СПК заселяли пораженные семенные канальцы и формировали эпителиальные структуры на базальной мембране, сохраняя жизнеспособность, пролиферативную активность и экспрессию своих генов-маркеров в течение, как минимум, четырех недель.

**Ключевые слова:** Сертоли-подобные клетки, клетки Сертоли, хлорид бензалкония, сперматогенез, трансплантация

**DOI:** 10.31857/S0475145022060064

ВВЕДЕНИЕ

Сперматогенез – сложный и тонко-регулируемый процесс, в поддержании которого задействованы несколько популяций соматических клеток, однако в непосредственном контакте с половыми клетками находятся только клетки Сертоли (КС) (Hess, Franca, 2008). Они формируют основу сперматогенного эпителия извитых семенных канальцев, где поддерживают развитие половых клеток, играя ведущую роль в гаметогенезе (Leblond, Clermont, 1952). Обширная функциональная активность КС приводит к высокой степени их дифференцировки и, как следствие, к ослаблению способности к их пролиферации. В результате этого популяция КС большинства видов млекопитающих не обновляется после наступления половой зрелости, а изолированные КС крайне плохо культивируются (Tarulli et al., 2012; Kulibin,

Malolina, 2016). Исключительная важность КС для поддержания сперматогенеза и невозможность восстановления их популяции в случае повреждения повышает интерес к поиску легко культивируемых аналогов КС.

Ранее нами было показано, что у мышей в сети семенника находится популяция Сертоли-подобных клеток (СПК), активно пролиферирующих в культуре (Kulibin, Malolina, 2016). СПК экспрессируют многие гены-маркеры КС (Malolina, Kulibin, 2019), в том числе и транскрипционный фактор *Dmrt1*, играющий важную роль в поддержании функциональной активности КС (Matson et al., 2011).

Известно, что КС неполовозрелых животных способны заново формировать семенные канальцы *in vitro* (Yokonishi et al., 2013) и восстанавливать поврежденные семенные канальцы при транс-

плантации (Shinohara et al., 2003). В экспериментах *in vitro* было показано, что СПК участвуют в образовании новых семенных канальцев при культивировании с КС мышонка (Малоллина, Кулибин, 2017), однако их регенеративный потенциал *in vivo* еще не был изучен.

Поэтому целью этого исследования стала оценка поведения и свойств СПК мышей после их трансплантации в семенник, опустошенный от собственных КС.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### *Экспериментальные животные*

В качестве доноров СПК использовали 2–5-месячных самцов мыши линии C57Bl/6-Tg(ACTB-EGFP)10sb/J, экспрессирующих GFP под промотором  $\beta$ -актина. Реципиентами выступали 2–3-месячные самцы линии C57Bl/6. Мышей содержали в условиях вивария с режимом день/ночь 12 ч/12 ч, воду и корм животные получали *ad libitum*.

### *Получение и культивирование СПК*

Суспензию СПК получали из фрагментов семенников, содержащих сеть семенника, по методике, описанной в работе (Кулибин, Малоллина, 2016). Кратко, ткань семенника последовательно инкубировали с растворами коллагеназы IV (3 мг/мл; Sigma) и ДНКазы I (0.1 мг/мл; Sigma), а затем трипсина (0.12%; Thermo Fisher) и ДНКазы I. Полученные клетки высаживали на культуральные планшеты, покрытые Matrigel (Corning), в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток/см<sup>2</sup> и культивировали 9 сут при 37°C и 5% CO<sub>2</sub> на среде DMEM/F12 с GlutaMAX (Gibco), содержащей пируват натрия (Sigma), инсулин/трансферрин/селенит (ITS, Thermo Fisher), пенициллин/стрептомицин (Пан-Эко) и 1% фетальной бычьей сыворотки (Thermo Fisher), а также Y-27632 (10 мкМ; Abcam), A-83-01 (0.5 мкМ; Sigma) и CHIR99021 (3 мкМ; Sigma). Смену среды проводили каждые 2 сут.

### *Опустошение семенников мышей-реципиентов от КС*

Для повреждения популяции собственных КС, мышам-реципиентам в семенные канальцы вводили физиологический раствор, содержащий катионный детергент хлорид бензалкония (ХБ, Sigma). Тестировали две концентрации ХБ: 0.02 и 0.1%. Мышей анестезировали изофлураном, делали разрез в брюшине, извлекали семенники и через выводной проток семенника в сеть семенника вводили стеклянный микрокапилляр толщиной 100 мкм. При помощи механического микроинъектора вводили 20 мкл раствора ХБ, подкрашенного бромфеноловым синим (1 : 100). В качестве контроля аналогичным способом вводили физиологический раствор.

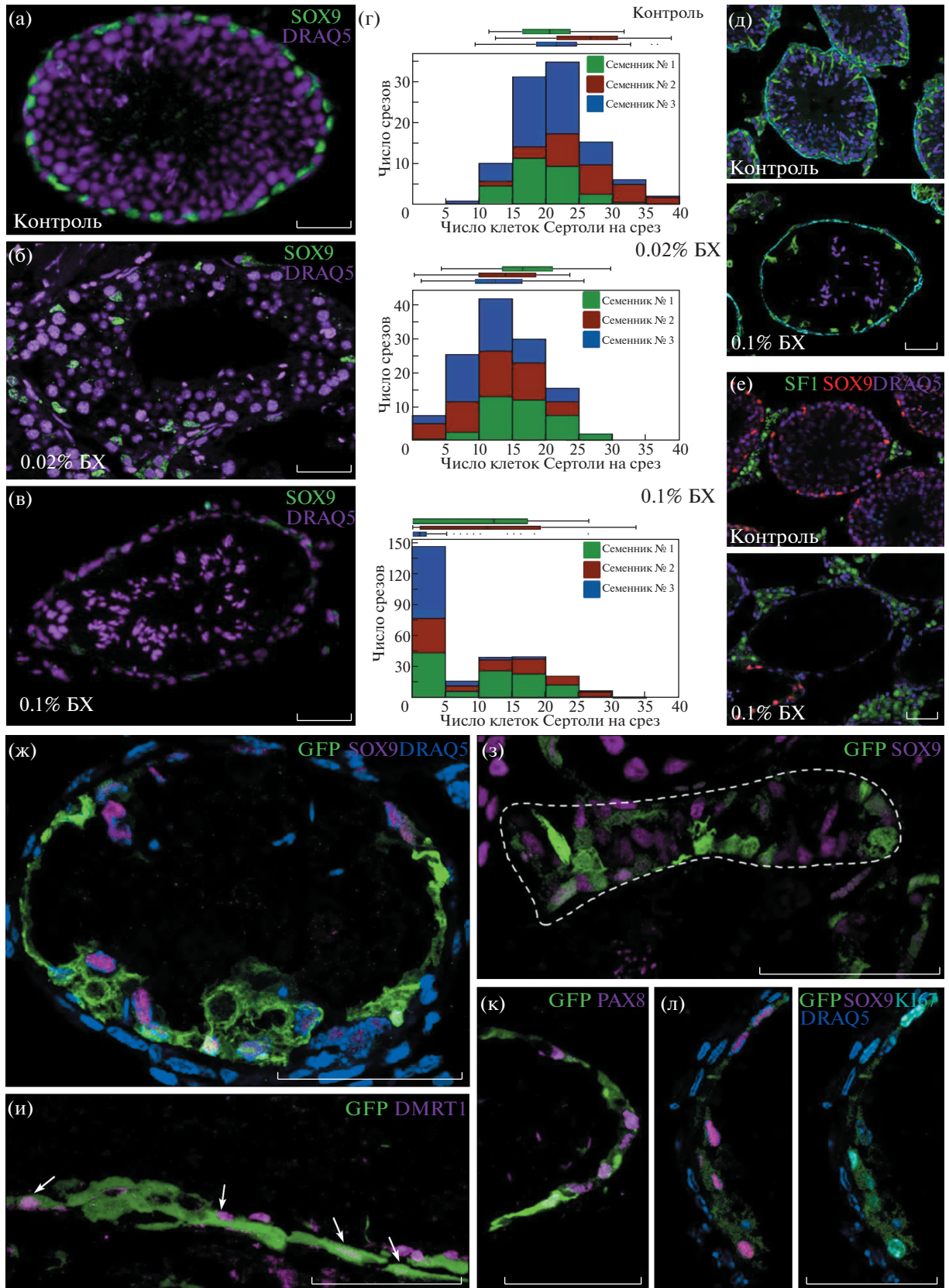
### *Трансплантация культуры СПК*

На 4 сут после инъекции ХБ в семенники мышей-реципиентов по методике, описанной выше, в семенные канальцы вводили по 20 мкл суспензии, содержащей  $8 \times 10^5$  клеток культуры СПК.

### *Иммунофлуоресцентная окраска семенников*

Образцы фиксировали 24 ч в 10%-ном забуференном формалине, обезвоживали, заключали в парафин и готовили срезы толщиной 4 мкм. Срезы депарафинировали, восстанавливали антигены кипячением в цитратном буфере и обрабатывали блокирующим раствором с 2% бычьим сывороточным альбумином. Далее срезы инкубировали с первичными антителами 1 ч при 37°C и после отмывания — со вторичными, 30 мин при 37°C. Использовали первичные антитела против SOX9 (Millipore, AB5535, 1 : 200), GFP (Abcam, ab13970, 1 : 400), PAX8 (Abcam, ab97477, 1 : 100), KI67 (Invitrogen, SolA15, 1 : 200), SF1 (Thermo Fisher, N1665, 1 : 50), ACTA2 (Abcam, ab5694, 1 : 100), VIM (Abcam, ab24525, 1 : 200), DMRT1 (Santa Cruz, sc377167, 1 : 50), и соответствующие вторичные антитела, конъюгированные с Alexa Fluor-488, 555, 594, 647 (Thermo Fisher, 1 : 500). Окраску мышечными антителами против DMRT1 осуществляли при помощи M.O.M. Immunodetection Kit (Vector Labs,

**Рис. 1.** Результаты воздействия ХБ на клетки семенника (а–е) на 4 сут после инъекции и результаты трансплантации СПК (ж–л). (а–в) репрезентативные фотографии извитых канальцев контрольных (а) и обработанных 0.02% (б) и 0.1% (в) ХБ семенников, окрашенных на SOX9. (г) диаграммы распределения числа КС на срез семенного канальца в контрольных образцах и после обработки 0.02% и 0.1% ХБ, в верхней части представлены диаграммы размаха. (д) репрезентативные фотографии извитых канальцев, окрашенных на ACTA2 (маркер ПМК) и VIM (маркер КС). (е) иммунофлуоресцентное окрашивание семенников на SF1 (маркер клеток Лейдига). (ж–л) репрезентативные фотографии срезов семенников мышей-реципиентов после трансплантации культуры СПК (зеленая окраска — трансплантированные клетки). (ж) СПК на базальной мембране канальцев мышей-реципиентов (14 сут). (з) канальце-подобная структура, образованная СПК в интерстициальной ткани (пунктир, 14 сут); (и) окраска на DMRT1 (стрелки — DMRT1<sup>+</sup> СПК). (к) окраска на PAX8. (л) окраска на SOX9 и KI67. Масштабный отрезок 50 мкм.



FMK-2201). Срезы фотографировали на микроскопе Leica TCS SP5 (Германия), и Zeiss LSM 880 Airyscan (Германия).

### Количественный анализ

Для количественной оценки влияния ХБ на КС делали серийные срезы семенников толщиной 4 мкм через каждые 100 мкм и подсчитывали число КС на поперечных срезах семенных канальцев (не менее 245 срезов на группу). Результаты представлены в виде гистограмм. Количественные данные представлены в виде: среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз. Сравнение количественных показателей выполняли с использованием одно-стороннего *U*-критерия Манна–Уитни.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В ходе первого этапа работы на гистологических срезах семенников проводили визуальный анализ действия ХБ на ткань семенника. Было установлено, что на 4 сут после инъекции детергента в части канальцев происходит гибель половых клеток и КС, что приводит к снижению толщины сперматогенного эпителия по сравнению с контролем (рис. 1а, 1б) и заполнению просветов канальцев дебрисом (рис. 1в). Доля пораженных канальцев зависела от концентрации раствора. Так, после введения 0.02% ХБ наблюдались единичные нарушения, а после 0.1% происходило поражение порядка половины канальцев. В семенниках контрольной группы нарушений в структуре сперматогенного эпителия обнаружено не было. На 7 сут после инъекции ХБ гистологическая картина нарушений сперматогенной ткани не изменялась по сравнению с 4 сут.

Количественную оценку эффективности удаления КС проводили путем подсчета числа КС на поперечный срез канальца семенника на 4 сут. КС детектировали по окраске на маркер SOX9. Влияние ХБ на появление канальцев с малым числом КС оценивали по первой четверти полученных распределений. В контрольных образцах это значение равнялось  $18.3 \pm 0.1$  КС на каналец (рис. 1а, 1г). Инъекция 0.02%-ного раствора ХБ привела к статистически достоверному ( $P \leq 0.05$ ) снижению показателя по сравнению с контролем до  $10.6 \pm 0.1$  (рис. 1б, 1г), при этом появилось 3 “пустых канальца” (меньше 3 КС) из 245 проанализированных. Введение 0.1% раствора ХБ привело к снижению первой четверти до  $0.3 \pm 0.03$  (рис. 1в, 1г), что статистически отличается ( $P \leq 0.05$ ) как от контроля, так и от меньшей дозы. Число

“пустых канальцев” равнялось 210 из 456 проанализированных (рис. 1г).

Несмотря на сильное воздействие 0.1%-ного раствора ХБ на число КС, его влияние на остальные популяции соматических клеток семенника не столь значительно. Так в канальцах с полностью разрушенным сперматогенным эпителием, где присутствовали лишь единичные КС, слой ПМК, окружающих семенные канальцы снаружи, не разрушался, ярко окрашивался на маркер АСТА2 и сохранял свою форму, что соответствует картине, наблюдаемой в контрольных образцах (рис. 1д). Окраска на SF1, который в семенниках половозрелых мышей высоко экспрессируется в клетках Лейдига, показала, что вокруг пораженных канальцев, так же, как и вокруг канальцев в контрольном семеннике, сохранялись группы этих клеток (рис. 1е).

Наши результаты согласуются с данными коллег (Yokonishi et al., 2020), впервые описавшими воздействие ХБ на сперматогенную ткань мышей, но в отличие от предыдущей работы, в нашем случае значительная гибель КС происходила при введении большей концентрации детергента (0.1 против 0.02%). Эти различия, вероятно, могут быть связаны с использованием разных производителей ХБ реагента. Механизм действия ХБ на эукариотические клетки изучен достаточно фрагментарно, однако на примере прокариот показано, что клетки с отрицательным зарядом подвержены большему влиянию со стороны детергента (Nagai et al., 2003). Эти данные подтверждаются и селективной активностью по отношению к нейронам толстой кишки крысы (Pan et al., 2011). В нашем случае, гибель КС скорее всего вызвана действием ХБ, в то время как гибель половых клеток опосредована снижением числа поддерживающих их развитие КС.

Исходя из всех вышеперечисленных данных, 0.1% раствор ХБ наиболее подходящий для подготовки семенников к трансплантации СПК. Введение клеток производили на 4 сут после инъекции детергента, а анализ результатов трансплантации – на 4, 14 и 28 сут. На всех сроках в семенниках реципиентов были найдены GFP<sup>+</sup> клетки донора, причем, преимущественно, в полностью опустошенных канальцах. СПК, идентифицированные по двойной окраске на GFP и SOX9, в одиночку или группами заселяли пораженные семенные канальцы, и, распластавшись по базальной мембране, формировали похожие на эпителий структуры (рис. 1ж). Подобные структуры возникали уже на 4 сут после трансплантации и присутствовали на всех сроках фиксации. Часть СПК, попавшая в интерстициаль-

ную ткань, образовывала там канальце-подобные структуры (рис. 1з). Так как из-за особенностей выделения в культурах СПК присутствует примесь ПМК, мы проанализировали клеточный состав трансплантатов. Доля СПК на 4, 14, 28 сут составила соответственно  $48 \pm 13.9$ ,  $56 \pm 15$ ,  $67 \pm 17.3\%$ . Трансплантированные СПК экспрессировали PAX8 (рис. 1к), транскрипционный фактор – маркер клеток сети семенника (Malolina, Kulibin, 2019), и только часть из них экспрессировала маркер КС – DMRT1 (рис. 1и). Судя по положительной окраске на KI67 (рис. 1л), многие СПК остаются в клеточном цикле даже на 28 сут после трансплантации.

В итоге, можно сделать выводы, что донорские СПК сохраняют жизнеспособность в семенниках реципиента по крайней мере в течение месяца. Они преимущественно заселяют разрушенные участки канальцев реципиентов, располагаясь на места погибших КС, и формируют эпителиальные структуры. СПК сохраняют экспрессию маркера сети семенника – PAX8 и продолжают пролиферировать, как и в условиях культуры. Окраска части СПК на DMRT1, экспрессия которого необходима КС для поддержания развития половых клеток, делает целесообразным проведение в будущем совместных трансплантаций СПК со сперматогонияльными стволовыми клетками.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН за использование оборудования.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках ГЗ ИБР РАН № 0088-2021-0009.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

При выполнении данного исследования все манипуляции с экспериментальными 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.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что какой-либо конфликт интересов отсутствует.

#### ИНФОРМАЦИЯ О ВКЛАДЕ АВТОРОВ

В.В. Мун выполнил всю экспериментальную работу и написал основной текст статьи. А.Ю. Кулибин, Е.А. Малолина разработали протокол эксперимента, участвовали в получении материала, в написании и редакции текста статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- Hess R., Franca L. Spermatogenesis and cycle of the seminiferous epithelium // Adv. Exp. Med. Biol. 2008. V. 636. P. 1–15.
- 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.
- Leblond C., 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.
- 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.
- Matson C., Murphy M., Sarver A. et al. DMRT1 prevents female reprogramming in the postnatal mammalian testis // Nature. 2011. V. 476. № 7358. P. 101–104.
- Merchel Piovesan Pereira B., Tagkopoulos I. Benzalkonium Chlorides: uses, regulatory status, and microbial resistance // Appl. Environ. Microbiol. 2019. V. 85. № 13. P. e00377-19.
- Nagai K., Murata T., Ohta S. et al. Two different mechanisms are involved in the extremely high-level benzalkonium chloride resistance of a *Pseudomonas fluorescens* strain // Microbiol. Immunol. 2003. V. 47. № 10. P. 709–715.
- Pan W., Zheng B., Gao Y. et al. Transplantation of neonatal gut neural crest progenitors reconstructs ganglionic function in benzalkonium chloride-treated homogenic rat colon // J. Surgical Res. 2011. V. 167. № 2. P. 221–230.
- Shinohara T., Orwig K., Avarbock M. et al. Restoration of spermatogenesis in infertile mice by Sertoli cell transplantation // Biol. Reprod. 2003. V. 68. № 3. P. 1064–1071.
- Tarulli G., Stanton P., Meachem S. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? // Biol. Reprod. 2012. V. 87. № 1. P. 1–11.
- Yokonishi T., McKey J., Ide S. et al. Sertoli cell ablation and replacement of the spermatogonial niche in mouse // Nat. Commun. 2020. V. 11. № 1. P. 40.
- Yokonishi T., Sato T., Katagiri K. et al. In vitro reconstruction of mouse seminiferous tubules supporting germ cell differentiation // Biol. Reprod. 2013. V. 89. № 1. P. 15.

## The Behavior of Sertoli-Like Cells when Transplanted into Sertoli Cell-Depleted Testes

V. V. Mun<sup>1,\*</sup>, A. Yu. Kulibin<sup>2</sup>, and E. A. Malolina<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Department of Embryology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119934 Russia*

<sup>2</sup>*Koltzov Institute of Developmental Biology of the Russian Academy of Sciences, ul. Vavilova 26, Moscow, 119334 Russia*

*\*e-mail: valeriy2125@gmail.com*

The intact population of Sertoli cells is crucial for the maintenance of male germ cell development. At sexual maturity, Sertoli cells of most mammals lose their ability to proliferate and to restore their population after damage. So, a search for alternative sources of Sertoli cells suitable for transplantation is an important goal. Sertoli-like cells (SLCs) from the adult rete testis might become such a source because they express many Sertoli cell marker genes but are capable of proliferation *in vitro*. We have already shown earlier that SLCs participated in the formation of tubule-like structures when they co-cultured with neonatal Sertoli cells. In the current study, we tested SLC properties *in vivo*. We carried out transplantations of cultured SLCs into mouse testes treated with a detergent benzalkonium chloride (BC), which was used for depleting Sertoli cells from testes earlier. Indeed, BC injections via the rete testis reduced the number of Sertoli cells. It was also demonstrated that donor SLCs settled in at basement membranes of damaged host seminiferous tubules and form epithelial structures. They retain their viability, proliferative capacity and expression of marker genes for at least four weeks.

*Keywords:* Sertoli-like cells, Sertoli cells, benzalkonium chloride, spermatogenesis, transplantation