

УДК 591.3

ИЗУЧЕНИЕ ОБЛАСТИ СЕТИ СЕМЕННИКА И ПРИЛЕГАЮЩИХ К НЕЙ СЕМЕННЫХ КАНАЛЬЦЕВ В ПОСТЭМБРИОНАЛЬНОМ РАЗВИТИИ МЫШИ

© 2017 г. Е. А. Малолина^{а, b}, А. Ю. Кулибин^{b, *}

^аФедеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России
123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18

^бИнститут биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН
119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26

*E-mail: Kulibin.A.BKRJ@gmail.com

Поступила в редакцию 26.11.2016 г.

Окончательный вариант получен 25.06.2017 г.

Область семенника, включающая в себя сеть семенника и прилегающую к ней транзитную зону (ТЗ) извитых семенных канальцев, до настоящего момента была изучена только с помощью гистологических и электронно-микроскопических методов. В то же время данные последних лет свидетельствуют, что клетки Сертоли (КС) половозрелых животных, расположенные в этой области, способны переходить к активной пролиферации как *in vitro*, так и *in vivo* и, следовательно, не полностью дифференцированы. Настоящая работа является первым исследованием сети семенника и ТЗ в постэмбриональном развитии мыши, направленным на выявление новых белковых маркеров клеток этой зоны, степени их дифференцировки и пролиферативной активности. Установлено, что клетки сети семенника транзитно, до 25 сут постэмбрионального развития, окрашиваются на Wt1, являющийся маркером КС, затем окраска на Wt1 пропадает. В то же время еще один маркер КС, транскрипционный фактор Dmrt1, играющий важную роль в процессе их дифференцировки, не экспрессируется клетками сети семенника в постнатальном периоде развития и у взрослых животных. Еще одним отличием клеток сети семенника от КС является более низкая пролиферативная активность на 2–6 сут. ТЗ КС экспрессируют Wt1 на всех изученных сроках, однако они гетерогенны по экспрессии Dmrt1 на начальные сроки, и только к 25 сут экспрессия этого маркера пропадает из ТЗ КС полностью. Интересно, что на 18 сут, когда КС в семенных канальцах завершают дифференцировку и выходят из клеточного цикла, пролиферация КС в ТЗ сохраняется на достоверно более высоком уровне. В условиях 3D-культуры показано, что Wt1⁺ клетки, выделенные из области ТЗ и сети семенника 60-суточных GFP мышей, способны формировать *de novo* семенные канальцы совместно с клетками семенника 6-суточных мышат.

Ключевые слова: клетка Сертоли, сеть семенника, пролиферация, дифференцировка, постэмбриональное развитие

DOI: 10.7868/S0475145017060027

ВВЕДЕНИЕ

Сеть семенника – первый отдел семявыводящих путей, представляющий собой у мыши несколько соединенных друг с другом полостей, лежащих прямо под поверхностью семенника в районе выхода крупных кровеносных сосудов (рис. 1) (Райцина, 1985). Извитые семенные канальцы, в которых проходит сперматогенез, соединяются с сетью семенника через прямые канальцы. Сеть семенника и прямые канальцы выстланы однослойным эпителием сходного ультраструктурного строения, высота которого изменяется в разных участках от плоского до кубического. Основу сперматогенного эпителия извитых семенных

канальцев составляют клетки Сертоли (КС), главной функцией которых является поддержание всех этапов развития мужских половых клеток, от сперматогонимальных стволовых клеток до сперматозоидов. Концевые участки извитых семенных канальцев, соединенные с прямыми канальцами, получили название транзитных зон (ТЗ) (Дум, 1974). В ТЗ происходит постепенное сужение канальцев за счет исчезновения из них половых клеток, таким образом, концевая часть ТЗ состоит только из КС, которые, по данным электронно-микроскопических исследований (Дум, 1974; Nykänen, 1979; Wrobel et al., 1986), имеют видоизмененную морфологию.

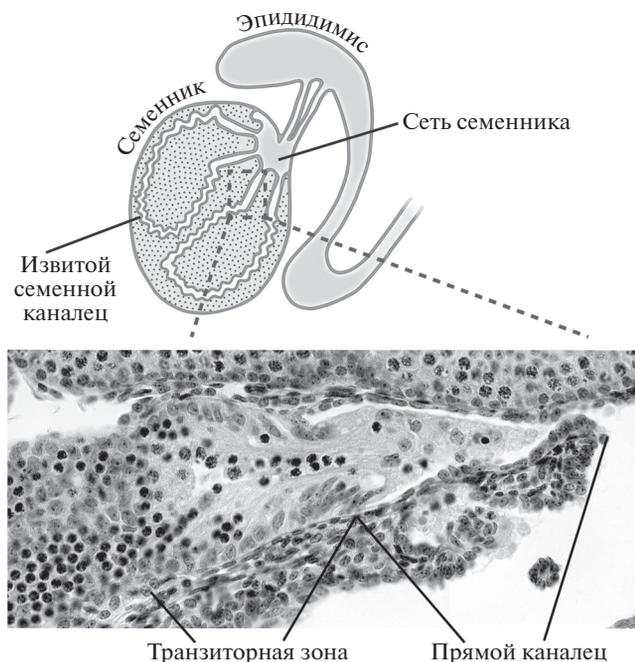


Рис. 1. Схема строения семенника мыши и более детальное изображение транзитной зоны семенника и прямого канальца на примере среза семенника 25-суточной мыши (окраска гематоксилин-эозин).

Согласно результатам исследований последних лет (Aiyama et al., 2015; Figueiredo et al., 2016; Kulibin, Malolina, 2016), КС половозрелых животных, происходящие из транзитной зоны семенных канальцев (ТЗ КС), способны к активной пролиферации *in vivo* и *in vitro*, в отличие от КС семенных канальцев, которые теряют свою способность к пролиферации в ходе дифференцировки в постэмбриональном развитии (Cupp, Skinner, 2005). Эти новые данные позволяют по-новому взглянуть на процесс дифференцировки КС и на возможность их дедифференцировки, а также на значение и функции области семенника, включающей в себя сеть семенника, прямые канальцы и ТЗ семенных канальцев. Однако до настоящего времени эта область семенника была изучена только на морфологическом и ультраструктурном уровнях. Неизвестны специфические белковые маркеры этой области, отсутствуют данные о степени дифференцировки ее клеток и уровне их пролиферативной активности в онтогенезе. Поэтому целью настоящей работы стало изучение пролиферативной активности и статуса дифференцировки клеток сети семенника и ТЗ в постэмбриональном развитии мыши. Была изучена экспрессия КС и клетками эпителия сети семенника и прямых канальцев таких белков-маркеров КС как транскрипционные факторы *Wt1* и *Dmrt1*; проведена количественная оценка пролиферативной активности этих клеток; про-

верена их способность формировать семенные канальцы в условиях 3D культуры.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Животные. В работе использовали самцов мышей линии C57Bl/6 в возрасте 2, 4, 6, 9, 12, 18, 25, 38, 45 и 60 сут, а также самцов мышей линии C57Bl/6-Tg(ACVB-EGFP)1Os/J, экспрессирующих *GFP* под промотором гена бета-актина, в возрасте 60 сут. Мышей содержали в стандартных условиях вивария с режимом день/ночь 12 ч/12 ч, воду и корм животные получали *ad libitum*. Всего в работе было использовано 40 животных. Все эксперименты с животными проводились 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.

Иммунофлуоресцентная окраска срезов семенников. На криотоме Leica CM1900 (Германия) готовили криосрезы (4 мкм толщиной) семенников в области, где располагаются ТЗ и сеть семенника. Срезы фиксировали в 4%-ном параформальдегиде (ПФА) в течение 12 мин, промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и инкубировали в течение 30 мин при 37°C в блокирующем растворе: 3%-ном бычьем сывороточном альбумине с 0.5% тритона X100 и 0.1% Tween20. Далее срезы помещали в первичные антитела против *Wt1* (Santa Cruz, США, 1 : 100) или в смесь первичных антител против *Wt1* и *Dmrt1* (Santa Cruz, 1 : 50) на 2 ч при 37°C. В последнем случае перед инкубацией в первичных антителах на срезы на 30 мин наносились Fab фрагменты (Jackson ImmunoResearch, США, 1 : 13) для блокирования неспецифического связывания антител к *Dmrt1*, сделанных в мыши. После промывки в PBS срезы инкубировали при 37°C в течение 30 мин с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с Alexa Fluor 488 и 594 (Thermo Fisher, США, 1 : 500). Ядра клеток подкрашивали DAPI (Sigma, США). Срезы просматривали и фотографировали на эпифлуоресцентном микроскопе Keyence BZ-9000 (Япония).

Анализ пролиферативной активности КС. За 2 ч до забора материала мышам возрастом 2, 6, 12 и 18 сут внутрибрюшинно инъецировали BrdU (Sigma), растворенный в физиологическом растворе, из расчета 10 мкг вещества на 1 г веса животного; использовали по 3 животных на каждую возрастную точку. После приготовления криосрезов (15 мкм толщиной) проводили двойную иммунофлуоресцентную окраску на *Wt1* и BrdU. Для этого сначала срезы окрашивали на *Wt1* по методике, описанной выше, изменив только условия инкубации в антителах: в первичных антителах срезы

инкубировали ночь при 4°C, во вторичных – 1.5 ч при 37°C. Затем срезы помещали в смесь 4 N HCl и 70%-ного этанола (1 : 1) и инкубировали в ней в течение 2 ч при комнатной температуре. Далее, после тщательной отмывки в PBS, срезы помещали в первичные антитела против BrdU (Santa Cruz, 1 : 100) на ночь при 4°C и завершали окраску аналогично описанной выше методике. Ядра клеток подкрашивали Toto3 (Thermo Fisher). Срезы просматривали и фотографировали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5. На фотографиях подсчитывали процент $Wt1^+$ /BrdU⁺ клеток относительно общего числа $Wt1^+$ клеток в извитых семенных канальцах, расположенных далеко от сети семенника, в канальцах и полостях сети семенника и отдельно в извитых семенных канальцах, открывающихся в сеть семенника. Подсчеты проводили на не менее чем 5 срезах с каждого семенника.

Получение 3D клеточных культур в коллагеновом матриксе. Семенники 60-суточных мышей линии C57BL/6-Tg(ACVB-EGFP)10sb/J под контролем бинокля разделяли на область извитых семенных канальцев и область, содержащую ТЗ и сеть семенника. Далее ткань подвергали энзиматической обработке коллагеназой IV типа (Sigma), ДНКазой I типа (Sigma) и трипсином (Thermo Fisher) по методике, описанной нами ранее (Kulibin, Malolina, 2016), с модификациями. Главной модификацией была посадка клеток на культуральные планшеты не в виде одноклеточной суспензии, а в виде фрагментов канальцев по 50–100 клеток. Подобный способ выделения позволил повысить концентрацию КС в культуре. Клетки культивировали в культуральных планшетах, покрытых матригелем (Corning, США), при 37°C в атмосфере 5% CO₂ в среде с 5% фетальной бычьей сыворотки FBS (HyClone, США). Через 24 ч культуры промывали, убирая не прикрепившиеся клетки, и культивировали еще 3 сут на среде, содержащей 1% FBS. Далее клетки обрабатывали раствором трипсина, получали одноклеточную суспензию и соединяли ее со свежесделанными клетками семенников 6-суточных мышей линии C57Bl/6 в соотношении 1 : 8. Клетки семенников 6-суточных мышей выделяли с помощью энзиматической обработки семенников коллагеназой IV типа, ДНКазой I типа и гиалуронидазой (Sigma), полученные смеси клеток заключали в коллаген I типа по методике, описанной нами ранее (Kulibin, Malolina, 2016), и культивировали на границе фаз жидкость/газ в среде с 10% заменителем сыворотки KSR (Thermo Fisher) в течение 7 сут.

Иммунофлуоресцентная окраска клеток в коллагеновом геле. Коллагеновые гели с клетками внутри фиксировали в 4%-ном ПФА в течение 12 мин, промывали PBS, помещали на 30 мин в блокирующий раствор и далее инкубировали ночь при

4°C в смеси первичных антител против $Wt1$ (1 : 100), Dmrt1 (1 : 50) и GFP (ThermoFisher, 1 : 400). После 30-минутной промывки в PBS гели инкубировали с соответствующими вторичными антителами при 37°C в течение 1.5 ч. Ядра клеток подкрашивали Toto3. Препараты просматривали и фотографировали на конфокальном микроскопе.

Статистический анализ. Количественные данные представляли в виде среднего \pm стандартная ошибка среднего и обрабатывали в статистическом пакете STATISTICA 8.0 (StatSoft, США), используя непараметрический критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Экспрессия $Wt1$ в ТЗ и сети семенника в постэмбриональном развитии мыши. Согласно данным иммунофлуоресцентного анализа, у 2-суточных мышцей на $Wt1$ окрашиваются как КС извитых семенных канальцев, так и клетки сети семенника (рис. 2а). На этом сроке полости сети семенника еще не выражены, но, тем не менее, ее легко можно идентифицировать по положению внутри семенника, отсутствию в ней гоноцитов и окраски на Dmrt1 (рис. 2а вставка). Экспрессия $Wt1$ в клетках сети семенника детектируется иммунофлуоресцентным методом также у 4, 6, 9, 12, 18 и 25-суточных животных. На рис. 2б представлен срез семенника 12-суточной мыши, видны извитые семенные канальцы и полости сети семенника, эпителий которых одинаково ярко окрашивается на $Wt1$, а также место вхождения семенного канальца в сеть семенника (отмечено стрелкой). На этом сроке, когда в семеннике мыши из половых клеток присутствуют только сперматогонии и первые мейотические клетки, четко выделить ТЗ не удастся. Но начиная с 18-х сут, когда число сперматозоидов значительно увеличивается, ТЗ начинают быть отчетливо видны. В качестве примера представлен срез семенника 25-суточной мыши (рис. 2в) с ТЗ, в которой последовательно исчезают дифференцированные половые клетки вплоть до участка, состоящего только из КС, граница между ТЗ и прямым канальцем отмечена стрелкой. При этом видно, что клетки сети семенника продолжают окрашиваться на $Wt1$ (рис. 2в), хотя и менее интенсивно, чем КС семенных канальцев. Экспрессия $Wt1$ в клетках сети семенника практически не детектируется, начиная с 38 сут постэмбрионального развития мыши: только в единичных клетках наблюдается слабый положительный сигнал, не сравнимый с ярким окрашиванием КС семенных канальцев. На рис. 2г представлен срез семенника 60-суточной мыши, где отчетливо видны переход семенного канальца в начальный отдел сети семенника – прямой каналец, скопление $Wt1^+$ ТЗ КС на границе этого перехода (отмечено стрелкой), а также исчезновение $Wt1^+$ клеток сразу за этим скоплением.

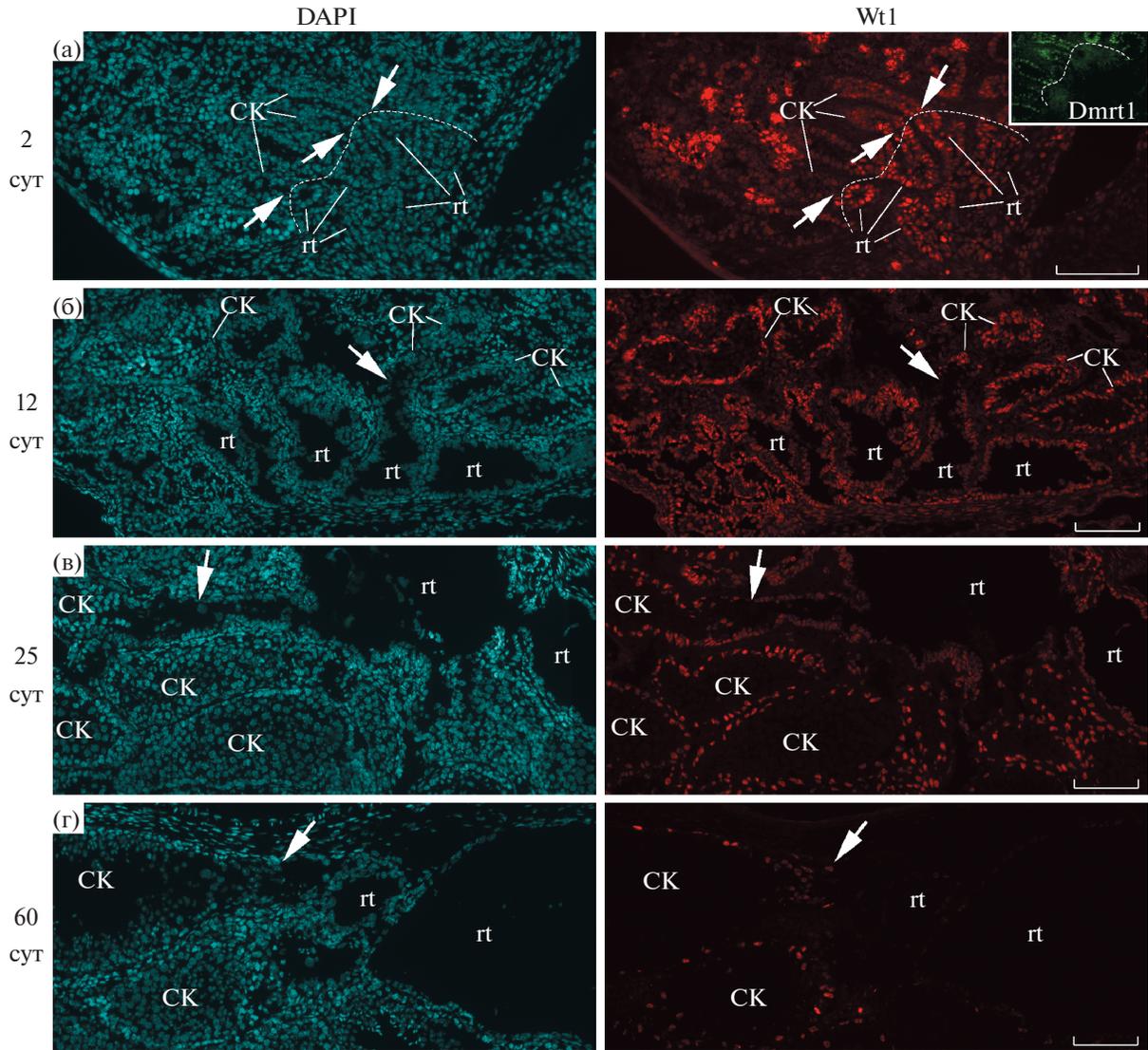


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов семенников мышей в возрасте 2 (а), 12 (б), 25 (в) и 60 сут (г) на Wt1 и Dmrt1 (вставка рис. 2а), ядра клеток докрашены DAPI. rt – сеть семенника, СК – семенной каналец, стрелки – места перехода СК в сеть семенника, пунктир – зона сети семенника, не окрашивающаяся на Dmrt1, стрелки – места перехода СК в сеть семенника. Масштабная линейка – 100 мкм.

Экспрессия Dmrt1 в ТЗ и сети семенника в постэмбриональном развитии мыши. Чтобы изучить экспрессию *Dmrt1* в КС мыши были проведены двойные иммунофлуоресцентные окраски срезов семенников на Wt1 и Dmrt1, так как *Dmrt1* является маркером не только КС, но и гоноцитов и недифференцированных сперматогониев. На все проанализированные сроки (2, 4, 6, 9, 12, 18, 25, 38, 45 и 60 сут постэмбрионального развития) окраска на Dmrt1 отсутствовала в клетках эпителия сети семенника, вне зависимости от того, окрашивались они на Wt1 или нет. В качестве примеров приведены фото срезов семенника 9, 18, 25-суточных мышей (рис. 3а, 3б, 3в), на которых сеть семенника положительно окрашена на

Wt1, но не окрашена на Dmrt1. На 9 сут в областях перехода семенных канальцев в сеть семенника (отмечены стрелками) встречались как Wt1⁺ клетки, ярко окрашенные на Dmrt1 (рис. 3а вставка 1), так и Dmrt1⁻ клетки (рис. 3а вставка 2). Однако на эти сроки уровень экспрессии *Dmrt1* сильно варьировал и в КС семенных канальцев. На 18 сут, когда впервые можно было выделить точные границы ТЗ (рис. 3б, переход ТЗ в прямые каналцы отмечен стрелками), в части канальцев ТЗ КС положительно окрашивались на Dmrt1, в то время как в других канальцах (рис. 3б, звездочки) экспрессия *Dmrt1* в ТЗ КС резко снижалась до не детектируемого уровня. На 25 сут ТЗ КС не окрашивались на Dmrt1 уже во всех проанализиро-

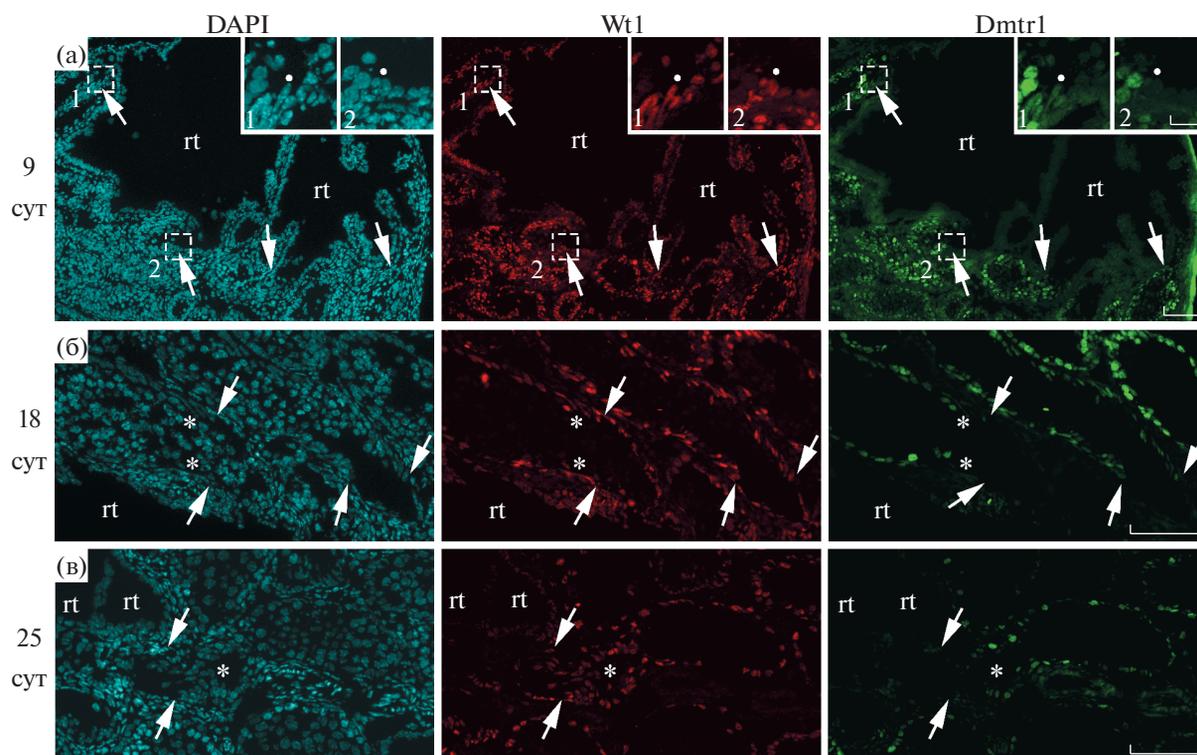


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов семенников мышей в возрасте 9 (а), 18 (б) и 25 сут (в) на Wt1 и Dmrt1, ядра клеток докрашены DAPI. а – в качестве примера приведены увеличенные области где семенные каналцы переходят в сеть семенника (пунктир) в которых ТЗ КС экспрессируют (вставка 1) и не экспрессируют Dmrt1 (вставка 2). rt – сеть семенника, стрелки – места перехода СК в сеть семенника, * – группы Dmrt1⁻ ТЗ КС, • – ядра ТЗ КС. Масштабная линейка на рисунках – 80 мкм, на вставках – 20 мкм.

ванных каналцах (рис. 3в), такая же картина наблюдалась и на все более поздние сроки: 38, 45 и 60 сут.

Уровень пролиферации Wt1⁺ клеток в разных зонах семенника мыши в постэмбриональном развитии. Подсчеты включения BrdU метки Wt1⁺ клетками эпителия сети семенника – показал, что в период активных делений КС (2 и 6 сут постэмбрионального развития) уровень пролиферации клеток сети семенника был в 2–3 раза ниже, чем КС (табл. 1). На 12 и 18 сут, когда деления КС уже почти полностью прекратились, уровень пролиферации в семенных каналцах и сети семенника был одинаково низким. Отдельно была подсчитана доля BrdU⁺ клеток среди КС семенных каналцев, открывающихся в сеть семенника и, таким образом, имеющих в своем составе ТЗ КС. На 2 и 6 сут доля пролиферирующих клеток в таких каналцах не отличалась от наблюдаемой в остальных семенных каналцах (табл. 1), однако на 12 и 18 сут уровень пролиферативной активности КС из семенных каналцев, содержащих ТЗ, была выше не только уровня сети семенника, но и семенных каналцев без ТЗ, причем на 18 сут – статистически значимо.

Активно пролиферирующие в культуре Wt1⁺ клетки, выделенные из области сети семенника и ТЗ, принимают участие в формировании *de novo* семенных каналцев в условиях 3D-культуры. Для проверки способности Wt1⁺ клеток, активно пролиферирующих в культуре, формировать семенные каналцы эти клетки выделяли из семенников 60-суточных GFP мышей и культивировали непродолжительное время для того, чтобы повысить их концентрацию (рис. 4). Wt1⁺ клетки, выделенные из области сети семенника и ТЗ, формировали колонии, клетки в которых, в отличие от КС из семенных каналцев, не окрашивались на Dmrt1 (рис. 4в, 4г). Далее клетки из культуры смешивали с клетками семенников 6-суточных самцов линии C57Bl/6 и помещали в 3D условия в коллагеновый гель. Смешивание с клетками семенника мышонка было необходимо, так как известно, что в формировании семенных каналцев принимают участие не только КС, но и другие соматические клетки, в том числе перитубулярно-мышечные клетки (Tung, Fritz, 1980). Иммунофлуоресцентный анализ коллагеновых гелей через 7 сут культивирования показал, что в них сформировалась целая сеть каналцеподобных структур с просветами и тяжей (рис. 5а). Часть

Таблица 1. Доля BrdU⁺ клеток среди Wt1⁺ клеток в разных зонах семенника мыши, %

Возраст мышей, сут	СК ^a	СК, открывающиеся в сеть семенника	Сеть семенника
2	22.70 ± 1.50 ^b	18.35 ± 1.55 ^c	7.31 ± 1.08 ^d
6	20.15 ± 1.61	21.76 ± 0.70 ^c	10.58 ± 0.90 ^d
12	1.00 ± 0.21	1.65 ± 0.50 ^c	0.51 ± 0.10
18	0.34 ± 0.03	0.85 ± 0.09 ^{c, d}	0.34 ± 0.03

^a СК – извитые семенные каналцы.

^b Данные представлены в виде среднее ± стандартная ошибка среднего; число проанализированных животных каждого возраста равно 3.

^c Отличие от сети семенника статистически значимо ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни).

^d Отличие от СК статистически значимо ($p < 0.05$, критерий Манна–Уитни).

GFP⁺ клеток располагалась между этими структурами и не окрашивалась на Wt1, по-видимому, это были перитубулярно-мышечные клетки, примесь которых присутствовала в исходной 2D культуре. GFP⁺/Wt1⁺ клетки, напротив, все располагались в канальцеподобных структурах, иногда по одиночке, но часто группами (рис. 5б), формируя стенку канальцев и перемежаясь с GFP⁻ КС 6-суточных мышат. Двойное иммунофлуоресцентное окрашивание гелей на Wt1 и Dmrt1 (рис. 5в) показало, что большая часть GFP⁺/Wt1⁺ клеток в канальцах экспрессировала Dmrt1, однако встречались и Dmrt1⁻ клетки (рис. 5в, стрелка).

Для сравнения, аналогичные эксперименты были проведены с КС извитых канальцев 60-су-

точных GFP мышей, выделенными в культуру. В таких гелях в составе тяжелой встречались только единичные GFP⁺/Wt1⁺ клетки (рис. 5г).

ОБСУЖДЕНИЕ

Компартмент семенника, включающий в себя сеть семенника (в том числе прямые каналцы) и транзиторные зоны извитых семенных канальцев, является самой неизученной областью мужской гонады. Большая часть информации, имеющейся об этой области семенника, происходит из работ 1970–1980-х гг. (Dym, 1974; Nykänen, 1979; Райцина, 1985; Wrobel et al., 1986) и представляет собой данные гистологического и электронно-микроскопического анализов. Вместе с тем, по-

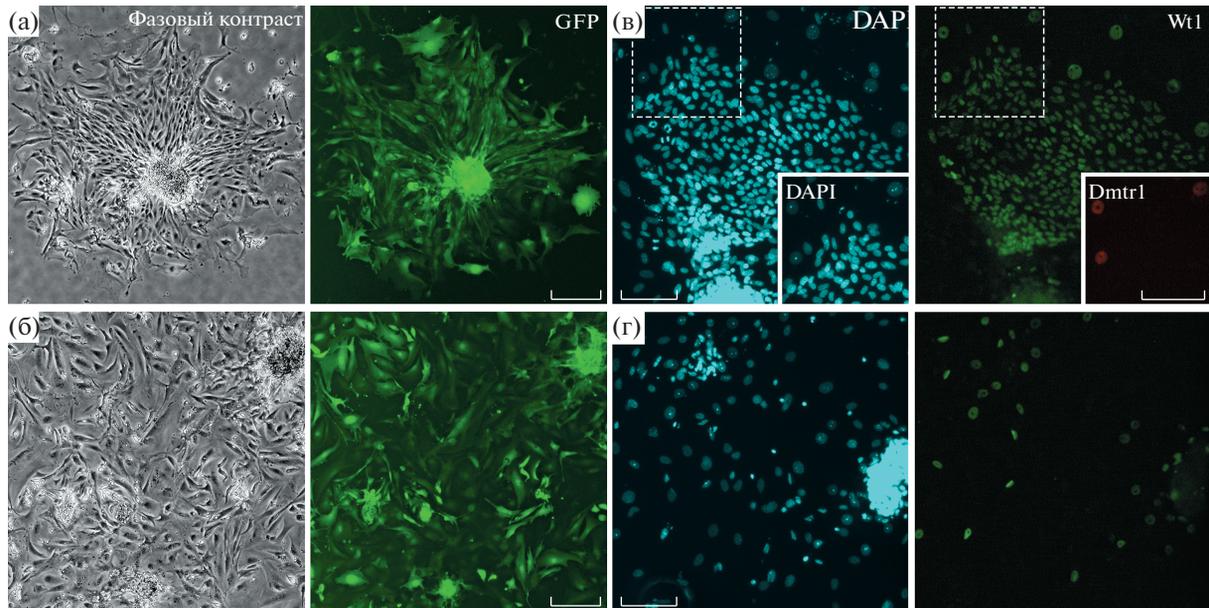


Рис. 4. Репрезентативные фотографии первичных культур, полученных из области, содержащей ТЗ и сеть семенника (а, в), и области извитых семенных канальцев (б, г) на 4 сут культуры. а, б – фотографии культур непосредственно перед помещением в гель, все клетки экспрессируют GFP. в – колония Wt1⁺ клеток ТЗ КС, сверху от колонии видны крупные Wt1⁺ ядра КС из семенных канальцев, которые в отличие от ТЗ КС окрашиваются также на Dmrt1 (вставка). г – в культуре, полученной из семенных канальцев, КС не образуют колоний. Масштабная линейка – 200 мкм.

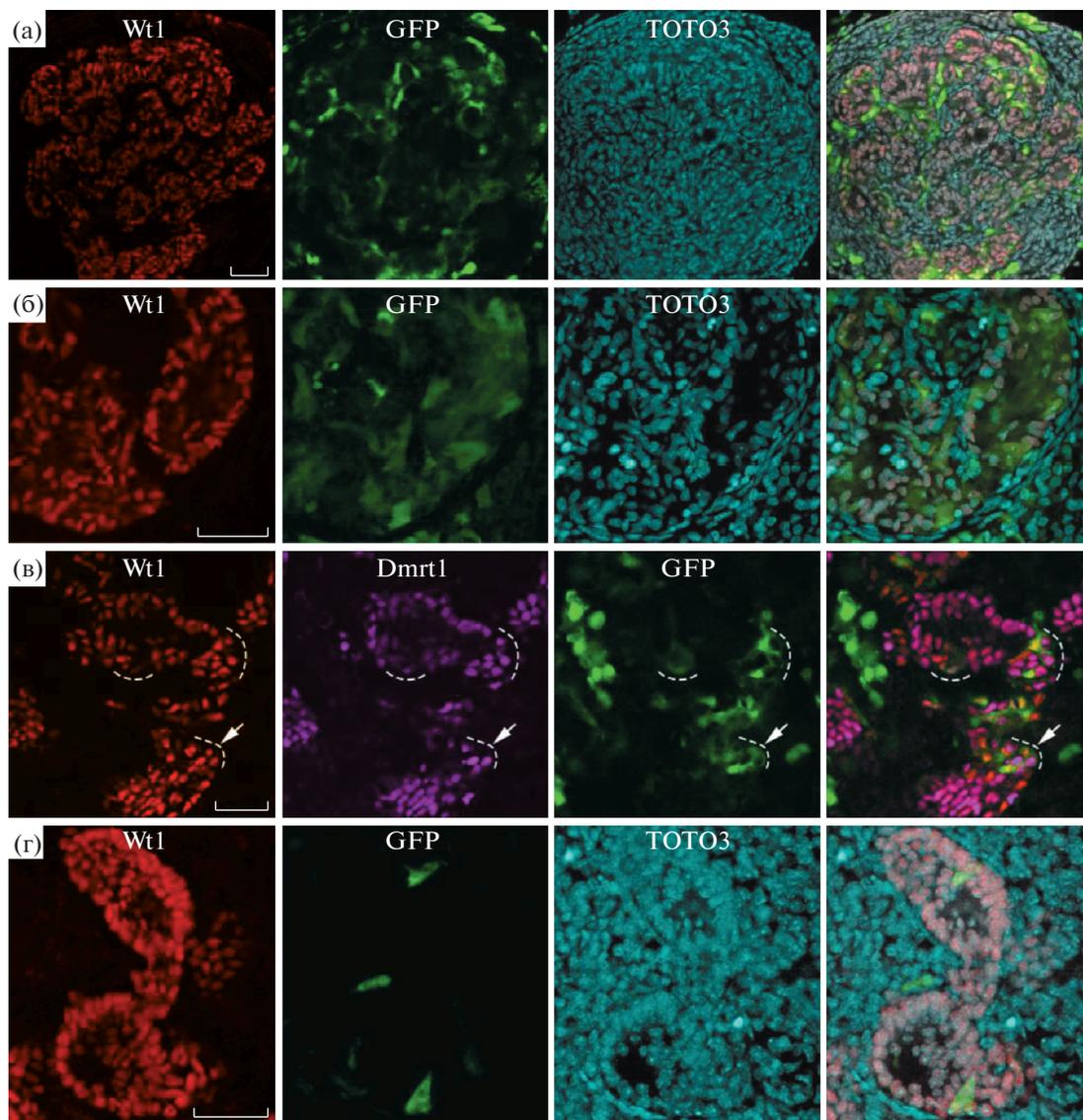


Рис. 5. Иммунофлуоресцентное окрашивание 3D культур в коллагеновом геле на *Wt1* и GFP (а, б, г) и *Wt1*, *Dmrt1* и GFP (в). а, б, в – культуры содержащие клетки из сети семенника и ТЗ, г – культуры с КС извитых семенных канальцев. Пунктирной линией обведены те участки канальцев, на которых присутствуют GFP^+ клетки, стрелки – $Wt1^+/GFP^+/Dmrt1^-$ клетка в канальце. Масштабная линейка – 50 мкм.

лученные нами ранее результаты (Kulibin, Malolina, 2016) о высокой пролиферативной активности и частичной дедифференцировке КС, выделенных из этого компартмента в культуру, говорят о необходимости по-новому изучить эту область семенника.

Одним из признанных маркеров КС является *Wt1* (Sharpe et al., 2003). Нами установлено, что у 2-месячных половозрелых мышей он экспрессируется только в КС, в том числе в ТЗ КС, а в сети семенника присутствуют только отдельные единичные $Wt1^+$ клетки. Однако анализ экспрессии этого маркера в ходе постэмбрионального развития мыши показал, что изначально все клетки се-

ти семенника экспрессируют *Wt1* и что его экспрессия исчезает из нее только между 25 и 38 сут. В то же время клетки сети семенника никогда в постэмбриональном развитии не экспрессируют другой маркер КС – *Dmrt1*. Интересно, что *Dmrt1* играет важную роль в процессах дифференцировки и трансдифференцировки КС, а его отсутствие в КС приводит к их неспособности завершить дифференцировку (Raymond et al., 2000; Kim et al., 2007; Matson et al., 2011; Minkina et al., 2014). В КС, располагающихся в транзитных зонах семенных канальцев, экспрессия *Dmrt1* не детектируется, начиная с 25 сут постэмбрионального развития, однако на более ранних сроках в зонах перехода

семенных канальцев в сеть семенника встречаются как $Dmrt1^-$, так и $Dmrt1^+$ КС.

Анализ уровня пролиферации $Wt1^+$ клеток в семенниках мышей на разные сроки постэмбрионального развития выявил значительные различия между изучаемыми зонами. Во время периода активной пролиферации КС (2 и 6 сут) клетки сети семенника вступали в митотический цикл в 2–3 раза реже, чем КС семенных канальцев. А в период завершения пролиферации и дифференцировки КС (12 и 18 сут) небольшое, но достоверное увеличение уровня пролиферации, по сравнению с КС семенных канальцев, было обнаружено у КС, расположенных в ТЗ.

Суммируя вышеизложенное, можно сказать, что клетки сети семенника, судя по экспрессии *Wt1*, являются производными целомического эпителия, а не мезонефроса, то есть происходят из общего с КС источника (Karl, Capel, 1998). Однако они отличаются от типичных КС семенных канальцев по экспрессии *Dmrt1* и пролиферативной активности, причем эти отличия видны уже в неонатальном периоде. ТЗ КС, по-видимому, занимают промежуточное положение между этими двумя популяциями клеток. Поэтому не исключено, что источником обнаруженных нами ранее в культуре (Kulibin, Malolina, 2016) колоний пролиферирующих $Wt1^+$ клеток являются не только ТЗ КС, но и клетки сети семенника, тем более что нами отмечено, что в культуре среди $Wt1^+$ клеток встречались как $Dmrt1^+$, так и $Dmrt1^-$ клетки, а также клетки со сниженной экспрессией *Dmrt1*. В связи с этим допущением особенно остро встает вопрос о способности клеток в колониях выполнять функции КС, в частности, их способности формировать семенные канальцы.

Для решения этого вопроса было проведено совместное культивирование выращенных в культуре $Wt1^+$ клеток, полученных от 60-суточных GFP мышей, с клетками семенника 6-суточных мышат. Продемонстрировано, что клетки из культуры формировали семенные канальцы *de novo* вместе с КС мышонка; все $Wt1^+/GFP^+$ клетки входили в состав канальцев и подавляющее большинство из них экспрессировало *Dmrt1* на том же уровне, что и КС 6-суточных мышат, в то время как в культуре $Wt1^+$ клетки в колониях не окрашивались на *Dmrt1*. Эти данные свидетельствуют о процессе дифференцировки $Wt1^+/GFP^+/Dmrt1^-$ клеток из культуры при формировании ими новых семенных канальцев, но их способность поддерживать развитие мужских половых клеток требует дальнейшего исследования.

Результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о том, что ТЗ КС и клетки сети семенника имеют общее происхождение и могут совместно являться источником активно проли-

ферирующих $Wt1^+$ клеток в культуре, способных к формированию семенных канальцев в условиях 3D-культуры.

Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН. Исследование поддержано грантом РФФИ (№ 16-34-60119 мол_а_дк) и Программой фундаментальных исследований президиума РАН “Фундаментальные исследования для разработки биомедицинских технологий”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Райцина С.С.* Сперматогенез и структурные основы его регуляции. М.: Наука, 1985. 207 с.
- Aiyama Y., Tsunekawa N., Kishi K., Kawasumi M., Suzuki H., Kanai-Azuma M., Kurohmaru M., Kanai Y.* A Niche for GFR α 1-positive spermatogonia in the terminal segments of the seminiferous tubules in hamster testes // *Stem Cells*. 2015. V. 33. № 9. P. 2811–2824.
- Cupp A.S., Skinner M.K.* Embryonic Sertoli cell differentiation // *Sertoli Cell Biology* / Eds Skinner M.K., Griswold M.D. San Diego; L.: Elsevier Academic Press, 2005. P. 43–70.
- 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.
- Figueiredo A.F., França 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.
- Karl J., Capel B.* Sertoli cells of the mouse testis originate from the coelomic epithelium // *Dev. Biol.* 1998. V. 203. № 2. P. 323–333.
- Kim S.L., Bardwell V.J., Zarkower D.* Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for *Dmrt1* in postnatal testis differentiation // *Dev. Biol.* 2007. V. 307. № 2. P. 314–327.
- 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.
- 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. P. 101–104.
- Minkina A., Matson C.K., Lindeman R.E. et al.* DMRT1 protects male gonadal cells from retinoid-dependent sexual transdifferentiation // *Dev. Cell*. 2014. V. 29. № 5. P. 511–520.
- Nykänen M.* Fine structure of the transitional zone of the rat seminiferous tubule // *Cell Tissue Res*. 1979. V. 198. № 3. P. 441–454.
- Raymond C.S., Murphy M.W., O’Sullivan M.G. et al.* *Dmrt1*, a gene related to worm and fly sexual regulators, is required for mammalian testis differentiation // *Genes Dev*. 2000. V. 14. № 20. P. 2587–2595.
- 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.
- Tung P.S., Fritz I.B.* Interactions of Sertoli cells with myoid cells in vitro // *Biol. Reprod.* 1980. V. 23. № 1. P. 207–217.
- Wrobel K.H., Schilling E., Zwack M.* Postnatal development of the connexion between tubulus seminiferous and tubulus rectus in the bovine testis // *Cell Tissue Res.* 1986. V. 246. № 2. P. 387–400.

Examination of Rete Testis and the Adjacent Seminiferous Tubules in the Mouse Testis During Postembryonic Development

E. A. Malolina^{1,2}, and A. Yu. Kulibin², *

¹*Gamaleya Federal Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russian, Gamaleya st. 18*

²*Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russian, Vavilova st. 26*

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

Received November 26, 2016; in final form, June 25, 2017

Testicular compartment that includes rete testis and the adjacent transitional zone (TZ) of seminiferous tubules has been examined only by light and electron microscopy until now. However, recent data suggest that adult Sertoli cells (SCs) located in this compartment are capable to commence active proliferation both in vitro and in vivo, and hence, are not completely differentiated. The present study is first to investigate mouse rete testis and TZ during the postembryonic development and is intended to determine new protein markers for cells of this compartment, the state of their differentiation, and also their proliferative activity. It was demonstrated that rete testis cells were stained for SC marker Wt1 transiently, until day 25 of postembryonic development, then the staining disappeared. Another SC marker Dmrt1 that involved in the process of SC differentiation was not expressed in the rete testis cells during the postnatal development and in the adult state. One more feature that distinguished rete testis cells from SCs was lower proliferative activity of rete testis cells in 2–6 days old mice. SCs from TZ expressed Wt1 at all ages examined. However, at earlier ages, they were heterogeneous on Dmrt1 expression, and only by day 25, Dmrt1 expression was completely disappeared from TZ SCs. It is interesting that on day 18 when SCs in seminiferous tubules complete differentiation and exit from cell cycle proliferation of TZ SCs was at significantly higher level. It is also showed that in 3D culture, Wt1+ cells isolated from rete testis and TZ of 60 days old GFP male mice were capable to form seminiferous tubules de novo in cooperation with testicular cells from 6 days old mice.

Keywords: Sertoli cell, rete testis, proliferation, differentiation, post-embryonic development