

РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ СПЕРМАТОГОНИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ И ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ПРЕКУРСОРОВ МЫШЕЙ ЛИНИИ C57Bl/6 С МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ

Е.Г.Скурихин, А.В.Пахомова, О.В.Першина, Л.А.Ермолаева, В.А.Крупин,
Н.Н.Ермакова, Э.С.Пан, А.И.Кудряшова, О.Ю.Рыбалкина,
Т.Б.Павловская, Н.В.Литвяков*, В.Е.Гольдберг*, А.М.Дыгай

НИИФиРМ им. Е.Д.Гольдберга, *Томский НИМЦ РАН, Томск, РФ

На модели угнетения сперматогенеза бусульфаном и *in vitro* исследовали свойства сперматогониальных стволовых клеток, эндотелиальных и эпителиальных прекурсоров семенников мышей линии C57Bl/6 в условиях метаболических нарушений. Показано, что сперматогониальные стволовые клетки (CD117⁺CD90⁺) и эпителиальные прекурсоры (CD45⁺CD31⁺Sca-1⁺CD49f⁺) из тестикул мышей с метаболическими нарушениями демонстрируют 17- и 28-кратный прирост клеточной массы соответственно и генерируют колонии *in vitro*. В то же время потенциал к самообновлению сперматогониальных стволовых клеток с иммунофенотипом CD51⁺CD24⁺CD52⁺ снижается. Сперматогониальные стволовые клетки (CD117⁺CD90⁺, CD117⁺CD90⁺) и эндотелиальные прекурсоры (CD45⁺CD31⁺) из тестикул мышей-доноров с метаболическими нарушениями демонстрируют высокую способность к приживлению в пораженных бусульфаном семенниках мышей линии C57Bl/6.

Ключевые слова: метаболические нарушения, воспаление, сперматогониальные стволовые клетки, эндотелиальные прекурсоры, эпителиальные прекурсоры

Согласно данным ВОЗ, распространенность бесплодия среди официально зарегистрированных разнополых браков составляет около 15% [13]. В большинстве случаев бесплодия приходится сталкиваться с такой проблемой, как гипогонадизм у мужчин [6]. Мужской гипогонадизм — плохо диагностируемое заболевание, т.к. его клинические проявления выражены слабо [2]. Считается, что нарушения углеводного и жирового обмена — одна из причин мужского гипогонадизма [8, 12]. Распространенность нарушений репродуктивной функции, вызванных метаболическим синдромом, достигает 75% [3].

Терапия гипогонадизма основывается на восполнении дефицита гормона тестостерона [3, 5]. Гормонотерапией удастся лишь уменьшить симптомы андрогенной недостаточности [9]. Восстановить численность сперматозоидов, функцию патологически измененных клеток, образующих ткань яичек, очень сложно.

Альтернативой гормональным препаратам для регенерации тканей семенников и половых клеток, может стать фармакологическая регуляция тканеспецифичных стволовых клеток. Ранее нами показано, что метаболические нарушения (МН) вызывают существенные изменения содержания сперматогониальных стволовых клеток (ССК), мезенхимных предшественников, гемопоэтических стволовых клеток, эндотелиальных и эпителиальных

прекурсоров в семенниках животных [4]. С какой популяцией незрелых клеток может быть связано восстановление мужской репродуктивной системы, не известно. Это не позволяет сформировать адекватную тактику фармакологической регуляции столовых и прогениторных клеток для лечения гипогонадизма.

Целью данного исследования являлось изучение *in vitro* и *in vivo* свойств ССК, эпителиальных и эндотелиальных прекурсоров семенников мышей линии C57Bl/6 с МН.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты выполнены на мышах-самцах линии C57Bl/6 ($n=50$), полученных из питомника отдела биомоделирования НИИФиРМ им. Е.Д.Гольдберга (квалификационный сертификат имеется). Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых в экспериментах или в иных научных целях. Исследование одобрено комитетом по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных НИИФиРМ им. Е.Д.Гольдберга (протокол IACUC № 114062016).

Рождение животных принимали за 0-й день эксперимента. МН моделировали однократным подкожным введением в область холки 200 мг/кг стрептозотоцина ("Sigma") в 30 мкл фосфатного буфера через 1 сут после рождения и диетой с 28-х по 70-е сутки, обогащенной тяжелыми насыщенными жирами (ssniff EF R/M with 30% Fat; кат. № E15116-34). Для контроля использовали корм ssniff EF R/M control (кат. № E15000-04). Мышей выводили из эксперимента на 70-е сутки после рождения передозировкой CO_2 . МН контролировали по уровню глюкозы в крови и глюкозотолерантному тесту (ГТТ) [11], глюкозозависимому инсулиночувствительному полипептиду, тестостерону и инсулину в сыворотке ("Cusabio Biotech Co., Ltd."), концентрации жиров и холестерина в крови.

Были выделены 5 групп мышей (по 10 особей в каждой). В 1-ю группу вошли интактные животные (интактный контроль); во 2-ю — мыши с МН (опытная группа); в 3-ю — мыши с нарушением сперматогенеза бусульфано́м; в 4-ю — мыши с нарушением сперматогенеза бусульфано́м, получавшие клетки из тестикул мышей интактного контроля; в 5-ю — мыши с нарушением сперматогенеза бусульфано́м, получавшие клетки из тестикул мышей с МН.

Потенциал к самообновлению стволовых и прогениторных клеток семенников мышей интактной и опытной групп оценили *in vitro* по методу [7] в нашей модификации. Ростовая среда состояла из среды DMEM, L-глутамина, БСА, антибиотиков, D-

глюкозы, β -эстрадиола, прогестерона, ЭТС, бычьего голо-трансферрина, инсулина, аскорбиновой кислоты, пирувата натрия, bFGF, EGF (все компоненты "Sigma"), 2-меркаптоэтанол ("ThermoScientific"). Инкубация проходила при 37°C, 100% влажности и 5% CO_2 в течение 7 сут. По окончании культивирования колонии собирали, механически разбивали на отдельные клетки. До и после культивирования изучали экспрессию поверхностных маркеров CD9, CD24, CD31, CD45, CD51, CD52, CD90, CD117 (c-kit), Sca-1, CD49f с использованием проточного цитофлюориметра "FACSCanto II" с программным обеспечением "FACSDiva" ("BD Biosciences"). По результатам цитометрических исследований делали вывод о потенциале к самообновлению ССК (CD117-CD90⁺, CD117⁺CD90⁺, CD51-CD24⁺CD52⁺), эндотелиальных (CD45-CD31⁺) и эпителиальных (CD45-CD31-Sca-1⁺CD49f⁺) прекурсоров.

В трансплантационном тесте оценивали эффективность приживления стволовых и прогениторных клеток семенников мышей-доноров 1-й и 2-й группы в семенниках мышей-реципиентов в условиях введения бусульфана [1, 10]. Внутривентрикулярное введение цитостатика в дозе 40 мг/кг принимали за 0-й день эксперимента. Нарушение сперматогенеза бусульфано́м контролировали по уровню тестикулярного тестостерона, патоморфологическим изменениям семенников, количеству ССК, сперматогоний (CD9⁺), эндотелиальных прекурсоров и эпителиальных прекурсоров в семенниках на 30-е сутки эксперимента. На 30-е сутки после введения бусульфана мышам-реципиентам в зону тестикул *rete testis* вводили фракцию недифференцированных клеток (10^4 клеток в 20 мкл фосфатного буфера) из семенников мышей-доноров 1-й или 2-й группы по протоколу [10] в нашей модификации. Клетки для трансплантации брали на 70-е сутки от начала моделирования МН. На 60-е сутки после введения бусульфана мышам-реципиентов 4-й и 5-й группы эвтаназируют в CO_2 -камере и проводили морфологическое исследование семенников и оценивали экспрессию поверхностных маркеров в тестикулярной ткани по сравнению с 3-й группой.

Математическую обработку полученных результатов проводили стандартными методами вариационной статистики.

Достоверность различий оценивали с использованием параметрического *t* критерия Стьюдента или непараметрического *U* критерия Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В результате введения стрептозотоцина и жировой диеты у мышей самцов линии C57Bl/6 наблюдалось

увеличение концентрации триглицеридов (на 11%) и ЛПОНП (на 37.5%) в сыворотке крови и индекса атерогенности (на 43%); концентрация сывороточных ЛПВП снижалась на 11.6% по отношению к интактному контролю. Одновременно с нарушением жирового обмена регистрировалась гипергликемия и нарушение ГТТ, повышался уровень инсулина и глюкозозависимого инсулиотропного полипептида в сыворотке крови, при этом концентрация свободного тестостерона уменьшалась (рис. 1). Выявленный комплекс изменений во многом соответствует клинической картине МН.

Ранее нами показано, что МН вызывают развитие патоморфологических изменения в тестикулярной ткани мышей-самцов C57Bl/6, свойственные гипогонадизму [4]. Одновременно в семенниках отмечалось тотальное уменьшение количества половых клеток и развивалась инфертильность. Сперматогенез в таких условиях поддерживается ССК. Между тем популяция ССК весьма неоднородна по экспрессии поверхностных маркеров и функциональной активности. Так, ССК с иммунофенотипом CD117⁺CD29⁺CD90⁺ представляют собой пул активно самообновляющихся предшественников половых клеток [14]. Экспрессия антигена CD117 является маркером дифференцировки ССК.

С какой из фракций ССК связаны поддержание и регенерация сперматогенеза при метаболическом гипогонадизме до сих пор не ясно. Мы оценили потенциал к самообновлению у ССК с иммунофенотипом CD117⁺CD90⁺, CD117⁺CD90⁺ и CD51⁺CD24⁺CD52⁺ *in vitro*. По нашим данным, пролиферирующие ССК CD117⁺CD90⁺ мышей с МН генерировали колонии и по окончании цикла культивирования демонстрировали более значительный (17-кратный) прирост клеточной массы по сравнению с интактным контролем (3-кратный) (рис. 2, а). Клеточная масса дифференцирующихся ССК CD117⁺CD90⁺ во 2-й группе снижалась на 26%, в 1-й группе возрастала в 3 раза (рис. 2, а). На ССК CD51⁺CD24⁺CD52⁺ мышей с МН и интактных культивирование оказывало ингибирующее действие (рис. 2, а).

Таким образом, у мышей с МН ССК CD117⁺CD90⁺ обладают значительным потенциалом к самообновлению, что свидетельствует о вовлечении этих клеток в регенерацию половых клеток при патологии. В условиях оптимальной жизнедеятельности сперматогенез обеспечивают дифференцирующиеся ССК CD117⁺CD90⁺.

Важный вопрос для тканевой регенерации — это вовлечение в этот процесс предшественников эндотелиальных и эпителиальных клеток. Проведенные

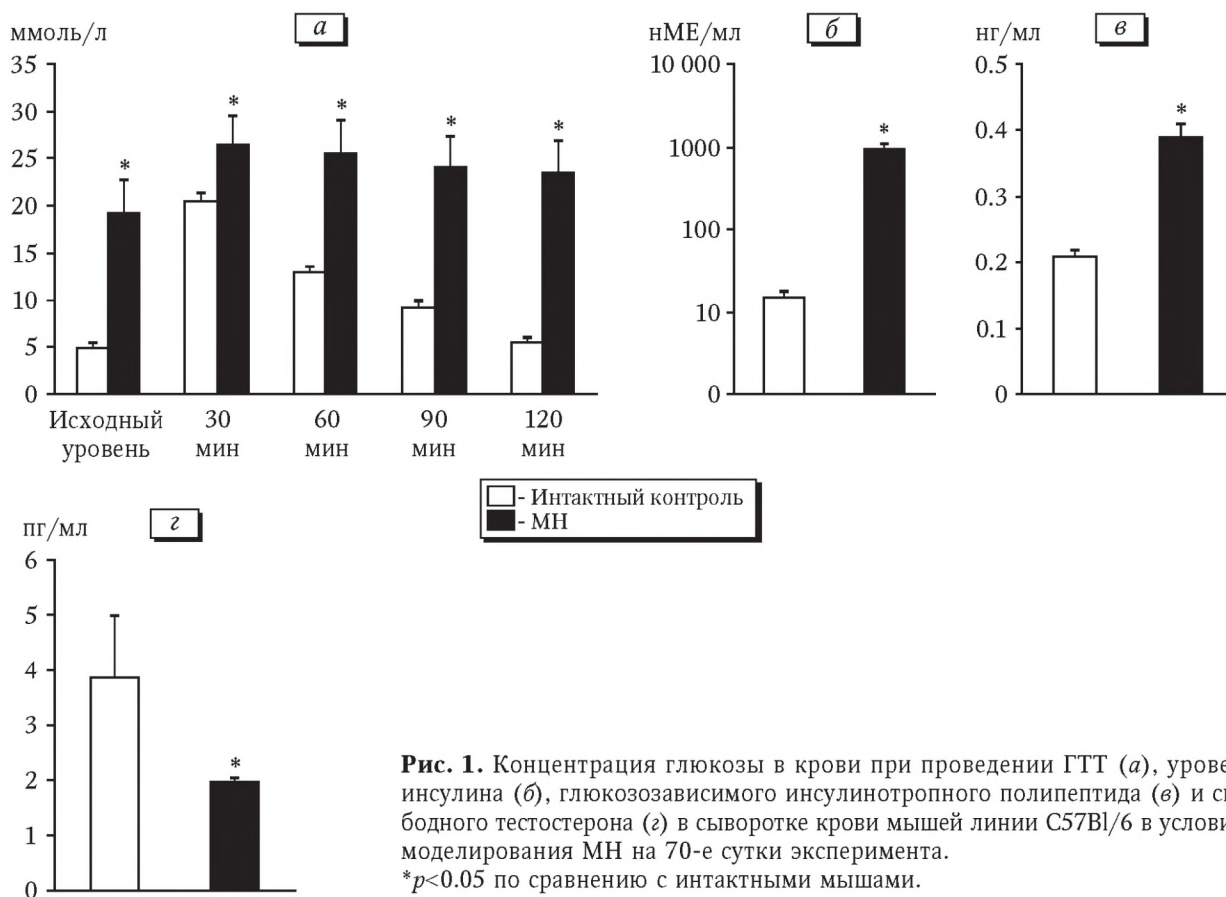


Рис. 1. Концентрация глюкозы в крови при проведении ГТТ (а), уровень инсулина (б), глюкозозависимого инсулиотропного полипептида (в) и свободного тестостерона (г) в сыворотке крови мышей линии C57Bl/6 в условиях моделирования МН на 70-е сутки эксперимента.

* $p < 0.05$ по сравнению с интактными мышами.

ранее патоморфологические исследования позволили нам сделать вывод о развитии гиперемии сосудов семенников животных с МН [4]. Такие незначительные нарушения микрососудистого русла объясняются низким потенциалом к самообновлению эндотелиальных прекурсоров ($CD45-CD31^+$) у мышей с МН (рис. 2, а). В то же время жировая диета вызывает слущивание эпителия в просвет канальца, сокращение числа слоев сперматогенного эпителия в семенных канальцах, разрежение слоев сперматогенного эпителия [4]. Такие деструктивные изменения канальцевого аппарата инициируют стимуляцию (в 28 раз) эпителиальных прекурсоров ($CD45-CD31-Sca-1^+CD49f^+$) (рис. 2, а).

В трансплантационном тесте мы оценивали способность к приживлению стволовых и прогениторных клеток семенников мышей C57Bl/6 с МН (мышь-доноры) в пораженных бусульфаном семенниках мышей C57Bl/6 (мышь-реципиенты). Бусульфановая модель нарушения сперматогенеза характеризовалась снижением концентрации тестикулярного тестостерона (до 18% от интактного контроля), тотальным опустошением семенных канальцев (отсутствовали зрелые половые клетки, сокращалась популяция сперматогоний ($CD9^+$), ССК с иммунофенотипом $CD117^+CD90^+$ и $CD51-CD24^+CD52^+$), некробиозом, деструкцией клеток сперматогенного эпителия и слущиванием их в просвет семенных канальцев (таблица; рис. 2, б, в). В извитых канальцах отсутствовали все слои сперматогенного эпителия вплоть до базальной мембраны, только в единичных канальцах обнаруживались клетки Сертоли и отдельные сперматocyты. Ядра клеток Сертоли были в состоянии набухания, цитоплазма вакуолизирована и фрагментирована. В сохранившихся сперматocyтах обнаружены такие дегенеративные изменения, как вакуолизация цитоплазмы и ядра, кариопикноз и кариорексис. Большая часть извитых канальцев запустевала. В небольшом количестве канальцев (до 3% от общего количества) формировались крупные струк-

туры с большим количеством пикнотизированных ядер, фрагментами ядер с интенсивно окрашенной цитоплазмой, так называемые “семенные шары”. Дополнительно цитостатик вызывал набухание неклеточных слоев собственной оболочки семенных

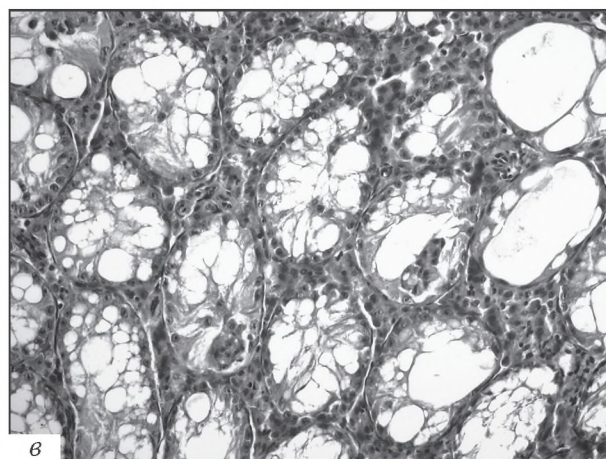
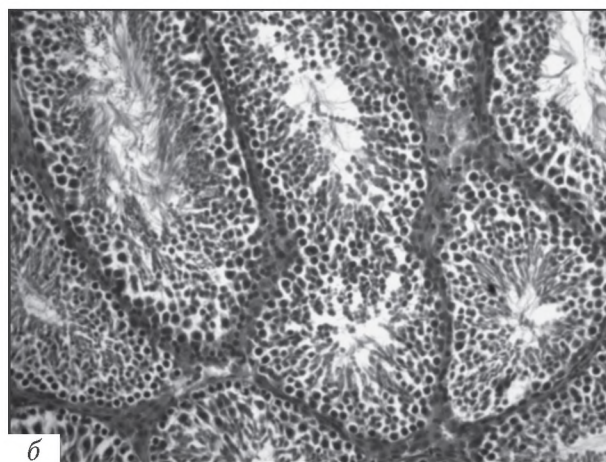
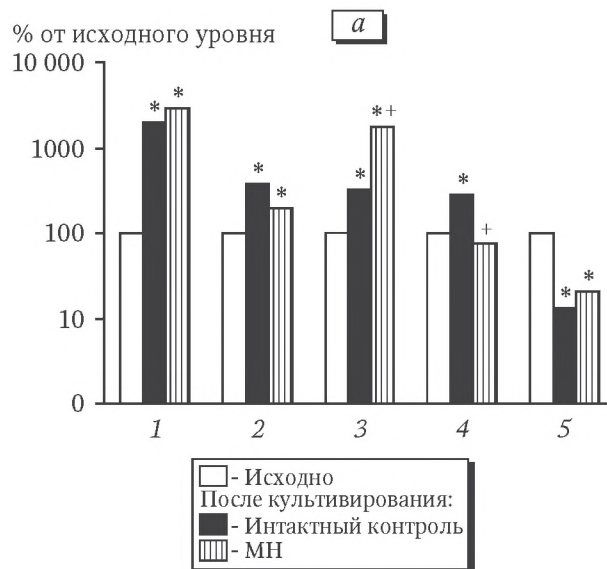


Рис. 2. Содержание ССК, эпителиальных и эндотелиальных прекурсоров тестикулярной ткани в питательной среде после культивирования (а) и морфологическая картина интактного семенника (б) и через 30 сут после внутрибрюшинного введения бусульфана в дозе 40 мг/кг (в). Окрашивание гематоксилином и эозином, $\times 200$ (б, в).

1 — эпителиальные прекурсоры ($CD45-CD31-Sca-1^+CD49f^+$); 2 — эндотелиальные прекурсоры ($CD45-CD31^+$); 3 — ССК ($CD117-CD90^+$); 4 — ССК ($CD117^+CD90^+$); 5 — ССК ($CD51-CD24^+CD52^+$).

$p < 0.05$ по сравнению * с исходным уровнем, + с интактным контролем.

канальцев, отек и просветление цитоплазматического матрикса миоидных клеток, увеличение площади интерстициальной ткани за счет отека и инфильтрации интерстиция лимфоцитами и макрофа-

гами и гемодинамические нарушения (рис. 2, б, в). Секретирующие тестостерон клетки Лейдига под влиянием бусульфана в большинстве своем разрушались, сохранившиеся клетки были веретеновидной

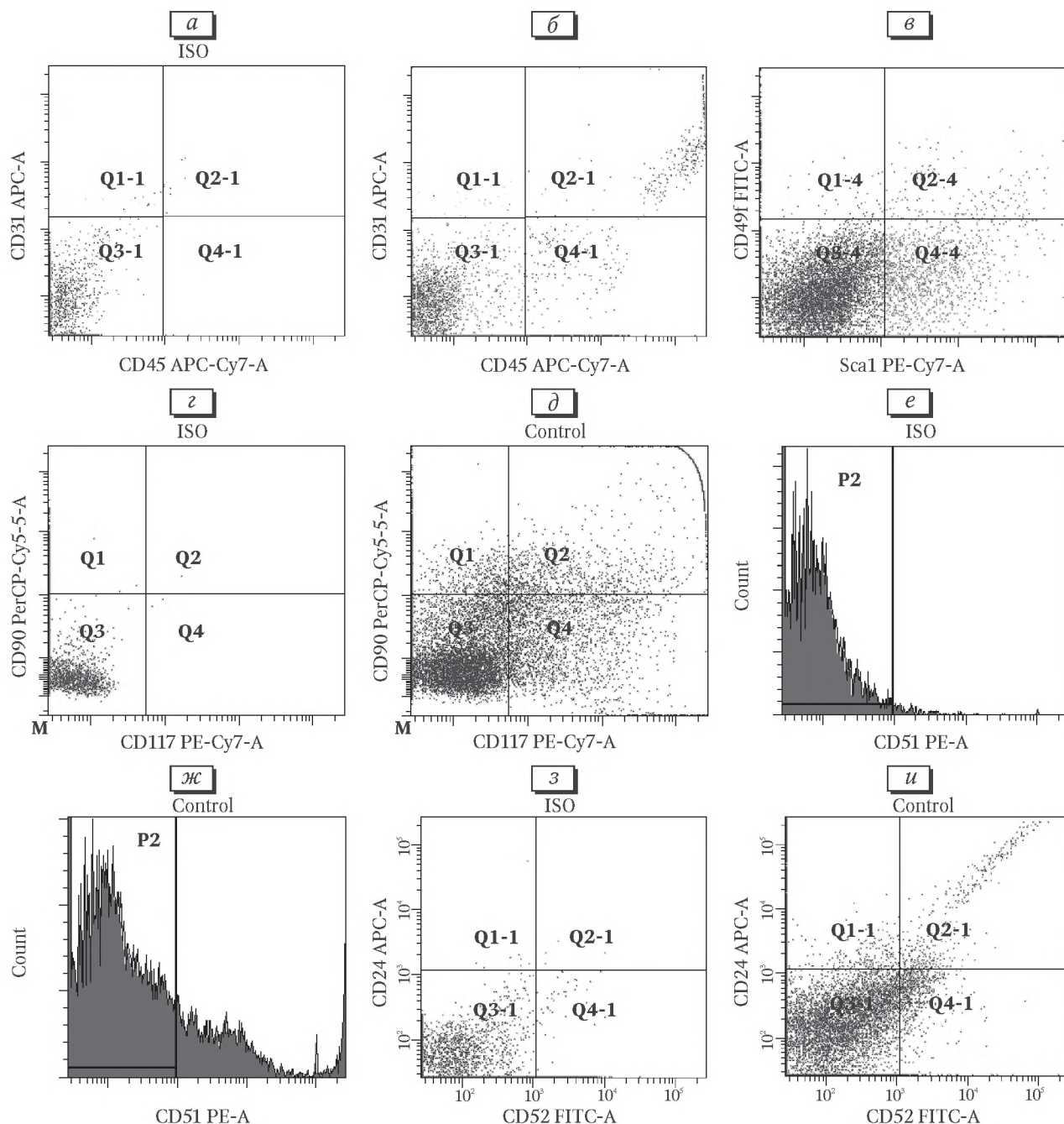


Рис. 3. Данные анализа количественной и качественной экспрессии ССК на мононуклеарах тестикулярной ткани intactных мышей линии C57Bl/6.

a — дот-плот изотипического контроля для IgG2a APC/IgG2b APC-Cy7; *б* — дот-плот подтверждения фенотипа экспрессии CD31/CD45; *в* — дот-плот подтверждения фенотипа экспрессии Sca-1/CD49f; *г* — дот-плот изотипического контроля для IgG2a PerCP-Cy5,5/IgG2b PE-Cy7; *д* — дот-плот подтверждения фенотипа экспрессии CD117/CD90; *е* — изотипический контроль для IgG2b PE; *ж* — подтверждение фенотипа CD51; *з* — дот-плот изотипического контроля для IgG2a APC/IgG2b FITC; *и* — дот-плот подтверждения фенотипа экспрессии CD24/CD52.

Содержание ССК, сперматогоний, эпителиальных и эндотелиальных прекурсоров в тестикулярной ткани мышей интактного контроля, мышей через 30 сут после введения бусульфана (40 мг/кг) и мышей-реципиентов после трансплантации (% от всех окрашенных мононуклеаров; $M \pm m$)

Популяция клеток	Интактный контроль (1-я группа)	Бусульфан (3-я группа)	Мыши-реципиенты с донорскими клетками от интактных мышей (4-я группа)	Мыши-реципиенты с донорскими клетками от мышей с МН (5-я группа)
Эпителиальные прогениторные клетки (CD45 ⁺ CD31 ⁺ Sca-1 ⁺ CD49f ⁺)	0.223±0.003	1.931±0.036*	0.485±0.020*	0.695±0.0275*
Эндотелиальные прогениторные клетки (CD45 ⁺ CD31 ⁺)	0.220±0.010	0.493±0.015*	1.445±0.083*	0.841±0.115*
ССК (CD117 ⁺ CD90 ⁺)	0.283±0.005	0.556±0.060*	4.046±0.028*	2.703±0.018*
(CD117 ⁺ CD90 ⁺)	26.878±0.847	5.973±0.199*	14.289±0.928*	9.026±1.037*
(CD51 ⁺ CD24 ⁺ CD52 ⁺)	1.012±0.004	0.5358±0.007*	0.828±0.046*	0.602±0.025
Сперматогонии (CD9 ⁺)	60.728±0.745	26.718±0.260*	8.326±0.819*	8.221±0.942*

Примечание. $p < 0.05$ по сравнению *с 1-й группой, *с 3-й группой.

формы или увеличены в размерах, их цитоплазма была гиперхромна и вакуолизирована. Закономерным итогом этих «катастрофических» изменений являлась инфертильность.

На 30-е сутки после введения клеточной фракции из семенников мышей-доноров с МН или интактного контроля (60-е сутки после введения бусульфана) отмечалось увеличение количества эндотелиальных прекурсоров и ССК с иммунофенотипом CD117⁺CD90⁺ и CD117⁺CD90⁺ в семенниках мышей-реципиентов (таблица; рис. 3). Прирост числа стволовых и прогениторных клеток при введении клеток интактного контроля был более значителен, чем при трансплантации клеток мышей с МН.

Таким образом, эндотелиальные прекурсоры (CD45⁺CD31⁺), ССК с иммунофенотипом CD117⁺CD90⁺ и CD117⁺CD90⁺ демонстрируют высокую способность к приживлению в пораженных бусульфаном семенниках. Эти клетки могут быть потенциальными мишенями для лекарственной стимуляции регенерации семенников при МН.

Следует отметить, что даже при высоком потенциале к самообновлению ССК (CD117⁺CD90⁺) и эпителиальных прекурсоров (CD45⁺CD31⁺Sca-1⁺CD49f⁺), способности приживляться в бусульфановых семенниках ССК (CD117⁺CD90⁺, CD117⁺CD90⁺) и эндотелиальных прекурсоров (CD45⁺CD31⁺) восстановления числа половых клеток до нормальных значений и регенерации сперматогенного эпителия и микрососудистой сети при МН не происходит. Объяснение этому мы видим в воспалении, которое сопутствует данной патологии. Нами было показано, что моделирование МН вызывает инфильтрацию тестикулярной ткани клетками воспаления,

увеличение концентрации IFN- γ (на 37%) и IL-17 (на 55%) в сыворотке крови, уровня TGF- β 1 (в 2.4 раза) и интерлейкинов: IL-2 (в 4.7 раза), IL-5 (в 3 раза), IL-17 (в 4 раза), IL-23 (в 1.7 раза) в семенниках. По-видимому, при МН медиаторы воспаления, оказывая ингибирующее действие на ССК и прогениторные клетки, нарушают программу регенерации тестикулярной ткани, что приводит к гипогонадизму и инфертильности.

ЛИТЕРАТУРА

1. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Т. 2 / Под ред. М.А.Пальцева. М., 2009.
2. Манушарова Р.А., Черкезова Э.И. Гипогонадизм у мужчин // Фарматека. 2014. № 12. С. 61-69.
3. Роживанов Р.В., Яшина Ю.Н. Аспекты применения андрогенной заместительной терапии при лечении гипогонадизма у мужчин с сахарным диабетом и метаболическим синдромом // Ожирение и метаболизм. 2015. Т. 12, № 1. С. 11-14.
4. Скурихин Е.Г., Пахомова А.В., Ермакова Н.Н., Першина О.В., Крупин В.А., Пан Э.С., Кудряшова А.И., Ермолаева Л.А., Дыгай А.М. Роль тканеспецифичных стволовых и прогениторных клеток в регенерации поджелудочной железы и тестикулярной ткани при диабетических нарушениях // Клет. технол. в биол. и мед. 2016. № 3. С. 180-187.
5. Corona G., Rastrelli G., Morelli A., Vignozzi L., Mannucci E., Maggi M. Hypogonadism and metabolic syndrome // J. Endocrinol. Invest. 2011. Vol. 34, N 7. P. 557-567.
6. Jungwirth A., Diemer T., Dohle G.R., Giwercman A., Kopka Z., Krausz C., Tournaye H. Guidelines on male infertility. European Association of Urology, 2014. [URL: https://uroweb.org/wp-content/uploads/17-Male-Infertility_LR.pdf].

7. Kanatsu-Shinohara M., Ogonuki N., Inoue K., Ogura A., Toyokuni S., Honjo T., Shinohara T. Allogeneic offspring produced by male germ Line stem cell transplantation into infertile mouse testis // *Biol. Reprod.* 2003. Vol. 68, N 1. P. 167-173.
8. Kupelian V., Page S.T., Araujo A.B., Travison T.G., Bremner W.J., McKinlay J.B. Low sex hormone-binding globulin, total testosterone, and symptomatic androgen deficiency are associated with development of the metabolic syndrome in nonobese men // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2006. Vol. 91, N 3. P. 843-850.
9. Lunenfeld B., Mskhalaya G., Zitzmann M., Arver S., Kalinchenko S., Tishova Y., Morgentaler A. Recommendations on the diagnosis, treatment and monitoring of hypogonadism in men // *Aging Male.* 2015. Vol. 18, N 1. P. 5-15.
10. Ogawa T., Aréchaga J.M., Avarbock M.R., Brinster R.L. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules // *Int. J. Dev. Biol.* 1997. Vol. 41, N 1. P. 111-122.
11. Pacini G., Ahrén M., Ahrén B. Reappraisal of the intravenous glucose tolerance index for a simple assessment of insulin sensitivity in mice // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2009. Vol. 296, N 5. P. R1316-R1324.
12. Paoletti R., Bolego C., Poli A., Cignarella A. Metabolic syndrome, inflammation and atherosclerosis // *Vase Health Risk Manag.* 2006. Vol. 2, N 2. P. 145-152.
13. WHO Manual for the Standardized Investigation, Diagnosis and Management of the Infertile Male. Cambridge, 2000.
14. Zhang M., Zhou H., Zheng C., Xiao J., Zuo E., Liu W., Xie D., Shi Y., Wu C., Wang H., Li D., Li J. The roles of testicular c-kit positive cells in de novo morphogenesis of testis // *Sci. Rep.* 2014. Vol. 4. P. 5936. doi:10.1038/srep05936.

Получено 05.08.16

