

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Павлюченкова Светлана Михайловна

**ИЗУЧЕНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ РАЗВИТИЯ МУЖСКИХ ПОЛОВЫХ
КЛЕТОК И КЛЕТОК СЕРТОЛИ У МЫШЕЙ ПОСЛЕ РАЗЛИЧНЫХ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ВОЗДЕЙСТВИЙ**

Специальность 03.03.05 – биология развития, эмбриология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук,
профессор С.Т. Захидов

Москва – 2014 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	10
I.1. Сперматогенез - система развития мужских половых клеток.....	10
I.2. Клетки Сертоли.....	20
I.3. Биологические эффекты модельного мутагена дипина.....	26
I.4. Методы культивирования сперматогенного эпителия и клеток Сертоли.....	31
I.5. Трансплантации сперматогенной ткани под капсулу почки.....	35
I.6. Биологические эффекты наночастиц.....	39
II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	43
II.1. Постановка экспериментов.....	43
II.2. Получение суспензии клеток семенника.....	44
II.3. Культивирование клеток Сертоли.....	45
II.4. Фиксация материала, приготовление и окрашивание препаратов.....	46
II.5. Цитогенетические методы.....	49
II.5.1. <i>Метод учета сперматогониальных и мейотических микроядер</i>	49
II.5.2. <i>Метод учета аномалий форм головок спермиев</i>	51
II.6. Цитоспектрофотометрический анализ	51
II.7. Метод деконденсации хроматина спермиев.....	52
II.8. Статистическая обработка данных.....	53
III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	54
III.1. Изучение динамики развития мужских половых клеток у мышей после интратестикулярного введения модельного мутагена дипина.....	54
III.1.1. <i>Количественная оценка</i>	54
III.1.2. <i>Морфогистологическая характеристика сперматогенного эпителия</i>	57
III.1.3. <i>Цитогенетический анализ</i>	67

III.1.4. Оценка способности к деконденсации <i>in vitro</i> хроматина эпидидимальных сперматозоидов.....	69
III.1.5. Оценка организации интерфазного ядра клеток Сертоли...	72
III.2 . Культивирование клеток Сертоли.....	84
III.3. Трансплантации сперматогенной ткани под капсулу почки.....	93
III.4. Изучение последствий многократного действия наночастиц золота на развивающиеся мужские половые клетки у мышей.....	102
III.4.1. Морфогистологическая характеристика	102
III.4.2. Цитогенетический анализ.....	105
III.5. Изучение процесса деконденсации хроматина в зрелых сперматозоидах мышей после однократного и многократного воздействия наночастиц золота на спермиогенные (постмейотические) клетки.....	109
III.6. Изучение процесса деконденсации хроматина в зрелых сперматозоидах мышей после обработки наночастицами золота в условиях <i>in vitro</i>	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ВЫВОДЫ	122
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы.

Развитие мужских половых клеток или сперматогенез представляет собой сложный длительный процесс, строго упорядоченный во времени и пространстве. Сперматогенный процесс завершается образованием большого количества сперматозоидов, основная функция которых сводится к доставке отцовского генома в яйцеклетку, что в свою очередь обеспечивает наследственную преемственность в ряду поколений.

Нормальное течение сперматогенеза во многом зависит от активности пула сперматогониальных стволовых клеток (ССК) и сопровождается чередой последовательных морфологических, генетических и биохимических изменений клеток. Система развития мужских половых клеток тесно взаимодействует с соматическими высокодифференцированными клетками Сертоли (КС), играющими видную роль в становлении, развитии и функционировании сперматогенного эпителия (Рузен-Ранге, 1980; Захидов и др., 2009 б; Cheng, Mruk, 2010; Drumond et al., 2011; Iwamori, 2014; Lucas et al., 2014).

На протяжении многих лет изучению сперматогенеза уделяют особое внимание специалисты в области экспериментальной эмбриологии, клеточной и молекулярной биологии, генетики, репродуктивной биологии. Эти исследования интересны в сравнительном эволюционном плане, а также с позиции познания механизмов регуляции процессов самообновления и коммитации ССК, клеточной пролиферации и дифференцировки, а также источников регенерации сперматогенной ткани после различных повреждений. Исследования сперматогенной системы в норме и после экспериментальных воздействий считаются актуальными и потому, что направлены на решение важных проблем практического плана. Например, мужского бесплодия, последствий действия вредных факторов окружающей среды, оптимизации условий трансплантации половых клеток и вспомогательных нишеобразующих КС, усовершенствование методов искусственного оплодотворения, криоконсервации (Novatta, 2001;

Brinster, 2002; Hardy et al., 2002; Gosden, Nagano, 2002; Handel, Sun, 2005; Keros et al., 2007; Jamsai, Bryan, 2011; Arregui, Dobrinski, 2014; Katib, Al-Hawsawi et al., 2014).

В связи с решением фундаментальных проблем и потребностями биомедицинских исследований в настоящее время особое место занимает разработка методов культивирования и трансплантации клеток сперматогенного эпителия (Ahmed et al., 2007; Goossens, Tournaye, 2007; Ahmed et al., 2009; Chui et al., 2010; Sato et al., 2011; Seandel, Rafii, 2011; Guo et al., 2014; Medrano et al., 2014; Sadri-Ardekani, Atala, 2014). Клеточные и тканевые культуры *in vitro* и эктопическая трансплантация имеют большие перспективы для практической медицины, например в области генной и клеточной терапии, в преодолении некоторых форм мужского бесплодия, криоконсервации стволовых клеток онкологических больных репродуктивного возраста с целью защиты их генетического потенциала от эффектов химио- и радиотерапии (Arregui, Dobrinski, 2014). Эти разработки могут иметь значение также при создании трансгенных животных и сохранении редких, исчезающих видов (Rodriguez-Sosa, Dobrinski, 2009).

Ускоренное развитие нанотехнологий, которое развернулось во многих странах мира, может грозить сильным загрязнением окружающей среде. Наночастицы, наноструктурированные материалы могут оказаться потенциально опасными для животного и растительного мира, здоровья человека. Нельзя исключить, что они будут обладать мутагенной и цитотоксической активностью. В этой связи следует добиваться тщательного изучения эффектов наночастиц на генетические и клеточные структуры. Тем более что в литературе уже появляются сообщения о вредных влияниях наноматериалов на живые организмы (Лысцов, Мурзин, 2007; Евдокимов, 2008; Захидов, 2010 а, б; Крысанов и др., 2011; Hoet et al., 2004; Iavicoli et al., 2013; Thakur et al., 2014; Xu et al., 2014). Важным направлением в области экспериментальной нанотоксикологии, на наш взгляд, должны стать исследования последствий нанокорпускул и их комплексов с другими молекулами на наследственные структуры и клетки зародышевого пути,

поскольку именно половые клетки связывают поколения между собой (Захидов, 2010а, б; Hoet et al., 2004).

Цель данной работы состояла в комплексном изучении закономерностей развития мужских половых клеток и КС у мышей после различных экспериментальных воздействий. В связи с этим были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Изучить во времени количественные, морфогистологические и цитогенетические изменения клеток сперматогенного эпителия, а также изменения в организации ДНП-комплекса в зрелых сперматозоидах, после интратестикулярного введения химического мутагена дипина;
- 2) Описать поведение высокодифференцированных клеток Сертоли в культуре;
- 3) Исследовать особенности регенерации сперматогенной ткани после трансплантации под капсулу почки;
- 4) Изучить процесс развития мужских половых клеток после многократного воздействия наночастиц золота;
- 5) Оценить характер деконденсации ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах после однократного и многократного воздействия наночастиц золота на спермиогенные (постмейотические) клетки;
- 6) Изучить в условиях *in vitro* процесс деконденсации хроматина в зрелых сперматозоидах мышей после воздействия наночастиц золота.

Научная новизна работы.

Впервые в сравнительном плане проведено комплексное изучение деструктивных и восстановительных процессов сперматогенеза у мышей после интратестикулярного введения химического мутагена дипина или физиологического раствора.

Дана цитогенетическая характеристика культуры КС половозрелых животных. Впервые установлено, что в культуре существуют КС с типичной организацией ядра, но при этом встречается весьма большое число клеток с микроядерными абберациями, протрузиями, двуядерные клетки и полиплоидные (тетра- и окта-) клетки; также отмечено изменение ассоциации ядрышковых организаторов и хромоцентров. Впервые доказана способность культуры КС вести себя как полиплоидизирующаяся клеточная популяция. Впервые установлено сосуществование в культуре КС двух популяций, различающихся по организации ядра и пролиферативной стратегии, что может быть проявлением гетерогенности, свойственной популяции КС половозрелых животных *in vivo*.

Впервые показано, что КС, находившиеся 12 дней в условиях *in vitro*, как и КС новорожденных мышат, проявили способность образовывать канальцеподобные структуры, содержащие КС. Впервые установлен факт длительного сохранения правильной организации семенных канальцев в трансплантатах после подсадки под капсулу почки канальцев от мутагенезированных животных.

Впервые изучены особенности развивающихся мужских половых клеток у мышей, подвергшихся многократному воздействию наночастиц золота.

Впервые установлено, что ультрамалые наночастицы золота способны нарушать процесс тиолиндуцированной деконденсации ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах в условиях *in vitro*.

Практическая и теоретическая значимость.

Результаты исследования особенностей сперматогенеза после интратестикулярного введения дипина или физиологического раствора могут быть использованы для адекватной оценки последствий интратестикулярных инъекций, активно разрабатываемых для стерилизации самцов. При этом необходимо учитывать возможность обратимости сперматотоксических эффектов и потенциального вклада в нарушения сперматогенеза механических повреждений (прокол семенника).

Методы подсчета числа ядрышек и гетерохроматиновых глыбок (реакция серебрения и окрашивание по Фельгену) могут быть рекомендованы к использованию для характеристики культур клеток.

Эктопическая трансплантация сперматогенной ткани может быть использована как удобная модель для оценки морфогенетического потенциала КС и может применяться специалистами в области клеточных технологий.

Примененный в работе метод тиолиндуцированной деконденсации ядерного хроматина сперматозоидов млекопитающих *in vitro* может быть с успехом использован для оценки различных химических и физических агентов, в том числе наноматериалов на сперматотоксическую активность.

Разработан новый способ приготовления давленных препаратов семенных канальцев, значительно облегчающий и ускоряющий цитологический и цитогенетический анализы развивающихся сперматогенных клеток и КС.

Результаты настоящей работы могут быть использованы в курсе лекций по биологии развития, токсикологии и репродуктивной биологии.

Апробация диссертации.

Результаты диссертационной работы были представлены на: УП Международной конференции «Молекулярная медицина и биобезопасность», (Москва, 2010); 2-ой Международной школе «Наноматериалы и нанотехнологии в живых системах. Безопасность и Наномедицина», (Московская область, 2011); XVIII, XIX и XXI Международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых "Ломоносов" (Москва, 2011, 2012, 2014); Всероссийской конференции с международным участием "Эмбриональное развитие, морфогенез и эволюция" к 135-летию со дня рождения П.П.Иванова (Санкт-Петербург, 2013).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 4 печатные работы, из них статей в журналах, соответствующих Перечню ВАК – 3 (все переведены на английский язык), 4 доклада на конференциях и 9 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 151 странице, содержит 38 рисунков и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы, включающего 293 цитируемых источника.

I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

I.1. Сперматогенез - система развития мужских половых клеток

В основе сперматогенеза, как и в основе формирования других клеточных систем или тканей, лежат стволовые клетки. К настоящему времени уже хорошо известно, что к стволовым клеткам в тканях взрослых организмов следует относить только те клетки, которые наделены способностью самообновляться и коммитироваться. Первое означает, что стволовые клетки, делясь, поддерживают собственный пул и сохраняют свойства "стволовости", а второе подразумевает переход на путь дифференцировки. Поведение стволовых клеток контролируется микроокружением, состоящим из нишеобразующих клеток. Стволовые клетки обеспечивают не только рост, но и регенерацию тканей. С возрастом активность стволовых клеток и их ниш может ослабевать (Iwamori, 2014).

В семенниках млекопитающих сперматогониальные стволовые клетки (ССК) сперматогенного эпителия обозначаются как сперматогонии типа A_s (или A_{single}). ССК в отличие от большинства других типов стволовых клеток могут быть идентифицированы морфологически и пространственно, а не только функционально. Это крупные, не соединенные цитоплазматическими мостиками клетки, имеющие ядра с диффузным хроматином. ССК являются унипотентными стволовыми клетками и дают начало только сперматогенным клеткам. Принято считать, что в семенниках млекопитающих ССК делятся симметрично, т.е. под влиянием регуляторных факторов. Из ССК образуются либо две стволовые клетки, либо две соединенные цитоплазматическим мостиком сперматогонии типа A_{pr} (A_{paired}) или $A_{спаренные}$ (рис. 1; рис. 2). В дальнейшем при делениях половых клеток цитокинез не будет завершаться до конца, и развитие клеток будет проходить в синцитии, содержащем потомков одной ССК (Захидов и др., 2009 а, б; de Rooij, Russell, 2000).

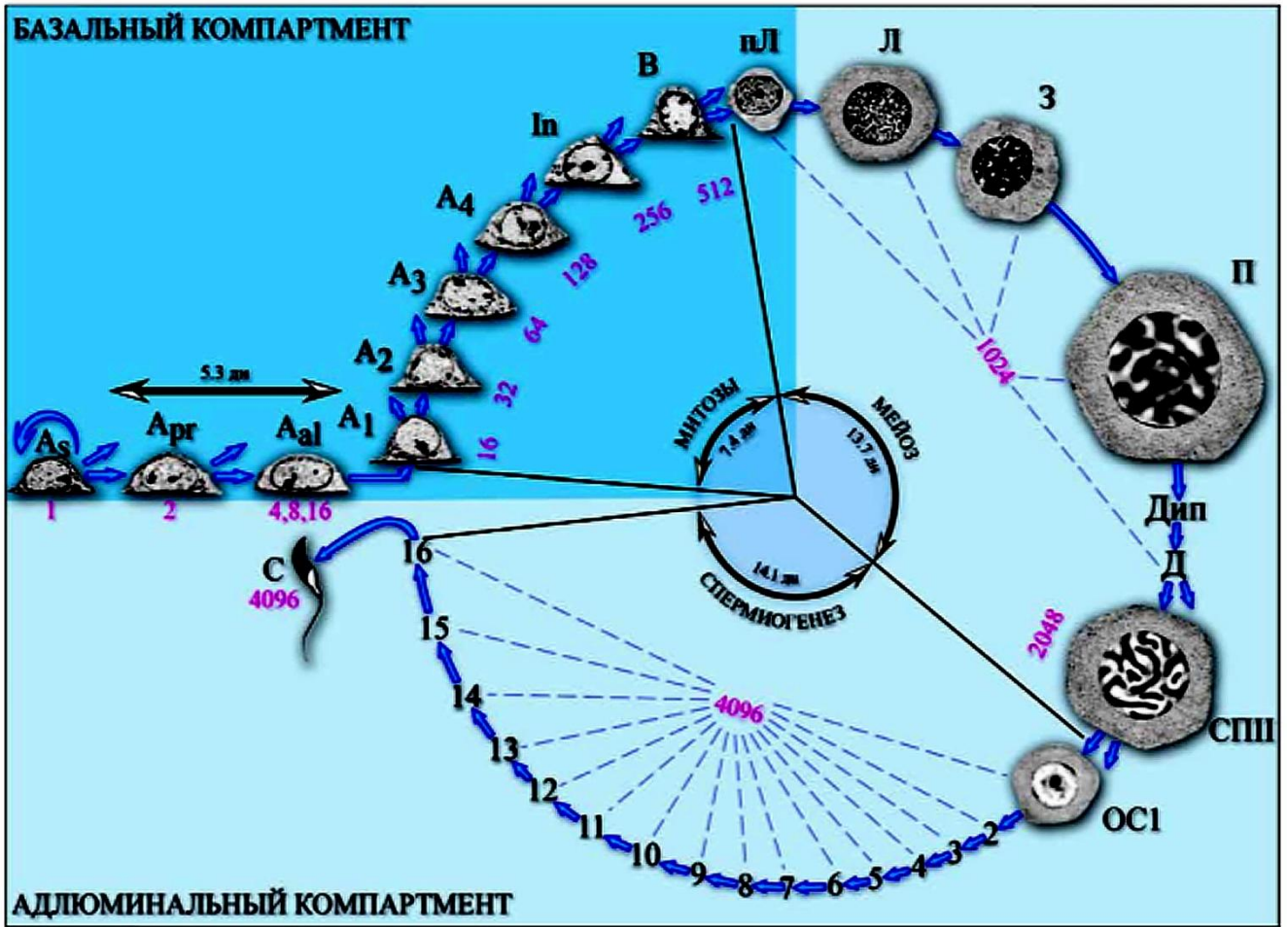


Рис. 1. Схема дифференцировки стволовых сперматогонимальных клеток в сперматозоиды (по данным Meistrich, 1986, с изменениями).

Обозначения: *As* – ССК, *Apr*, *Aal* – недифференцированные сперматогонии, *A1-4*, *In*, *B* – дифференцированные сперматогонии, *nL*, *L*, *3*, *II*, *Дип*, *Д* – прелептотенные, лептотенные, зиготенные, пахитенные, диплотенные, диакинетические сперматоциты I порядка, *СПИ* – сперматоциты II порядка, *ОС1* – округлые сперматиды, *1-16* – стадии дифференцировки сперматид в сперматозоиды, *С* – сперматозоид, *1-4096* – теоретически ожидаемое число половых клеток, которое может образоваться из одной вступившей в дифференцировку *As*.

Согласно принятой большинством исследователей модели Оакберга и Хаккинса (1976), *A_{pr}*, митотически делясь, превращаются в цепочки из 4–16 клеток, представляющих собой уже следующий тип сперматогониев – *A_{al}* (*A_{aligned}*)

или А-групповые. Сперматогонии A_{a1} (без клеточного деления) трансформируются в сперматогонии типа A_1 , которые, делясь, дают начало сперматогониям A_{2-4} , I_n и B . Это так называемые дифференцированные сперматогонии (см. Захидов и др., 2009 а, б; de Rooij, Russell, 2000). Выживание и пролиферация дифференцирующихся сперматогониев типа A_1 - A_4 зависят от взаимодействия между рецептором c-kit - протоонкогенным белком, располагающимся на поверхности МПК (мужских половых клеток) и его лигандом - фактором стволовой клетки SCF, продуцируемым КС (см. ниже).

Разделение сперматогониев на различные типы основано на кинетике их клеточного цикла, а также на морфологических особенностях ядер. Так недифференцированные сперматогонии могут делиться во время любой стадии цикла сперматогенного эпителия нерегулярно, но A_1 уже регулярно (рис. 2). Через 5.3 сут после того как ССК вступит в дифференцировку она достигнет стадии сперматогония A_1 (Meistrich, 1986) и все последующие деления сперматогониальных клеток имеют четкие временные ограничения. Промежуток времени, за который проходят деления всех дифференцированных сперматогониев, составляет 7.8 сут. По мере дифференцировки сперматогониев удлиняется S-фаза клеточного цикла, а G_2 -фаза, наоборот, укорачивается; увеличивается количество гетерохроматиновых глыбок в ядрах, что отражает постепенное снижение транскрипционной активности в дифференцирующихся половых клетках.

В результате деления сперматогониев типа B образуются сперматоциты I порядка и начинается следующая стадия сперматогенеза – мейоз, длящийся 13-14 сут (Meistrich, 1986) и заканчивающийся формированием генерации гаплоидных клеток – округлых сперматид. Он включает в себя два последовательных деления, первое из которых является редукционным (в каждой из дочерних клеток остается по одной из пары гомологичных хромосом), второе – эквационным (расходятся сестринские хроматиды и набор хромосом становится равным гаплоидному). Большая часть времени (до 90%) приходится на сложную профазу I, поэтому

сперматоциты I легко обнаруживаются на гистологических срезах семенников, а сперматоциты II практически неуловимы.

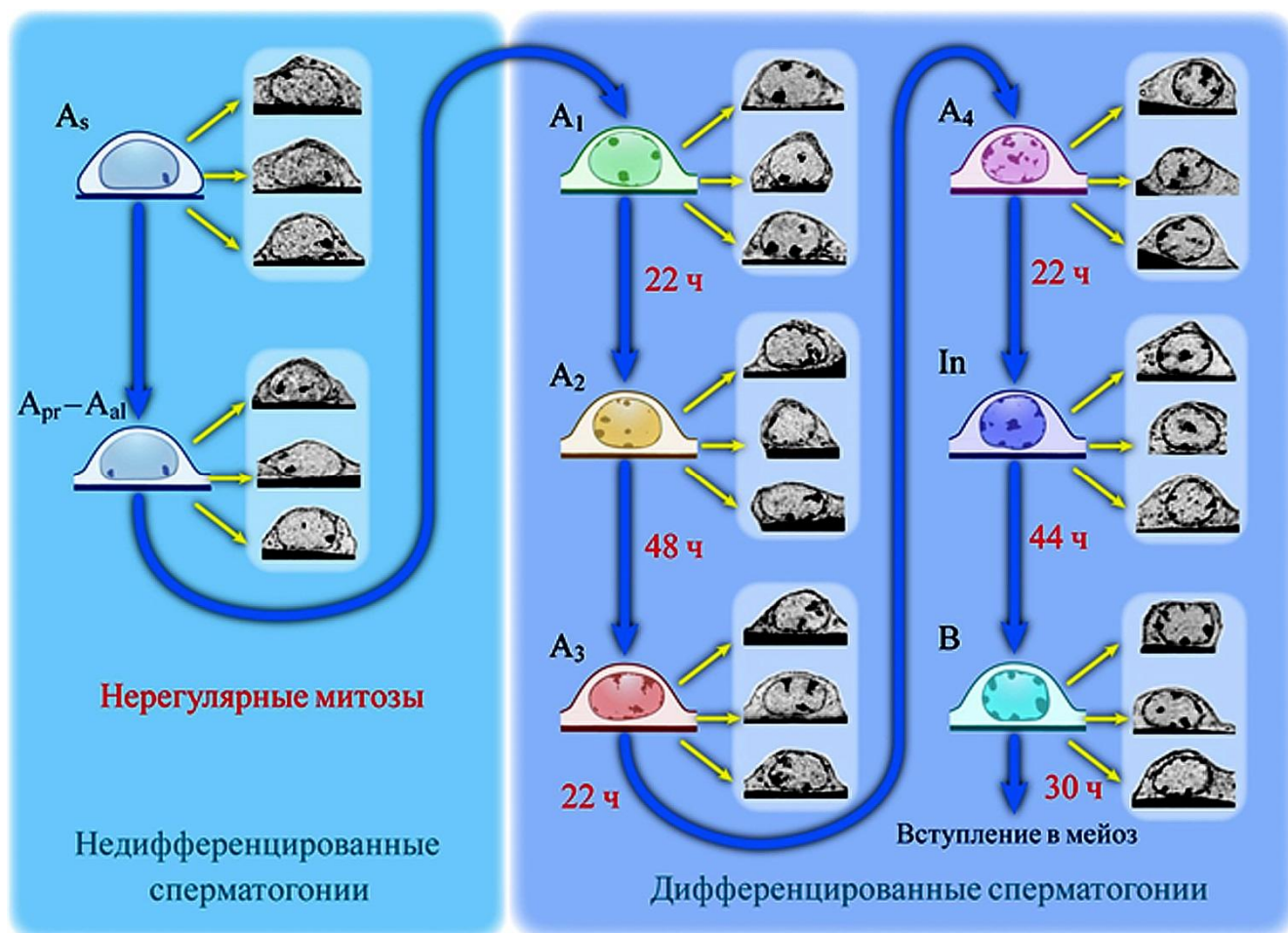


Рис. 2. Морфология сперматогониальных клеток мышцы и кинетика их дифференцировки (по данным Chiarini-Garcia et. al, 2001).

Обозначения: A_s – ССК, A_{pr} , A_{al} – недифференцированные сперматогонии, A_1-4 , In , B – дифференцированные сперматогонии.

Хорошо известно, что в длительной профазе I мейоза, которая делится на несколько стадий, происходят основные события на цитогенетическом уровне.

На стадии прелептотены-лептотены хромосомы пока слабо спирализованы, раскручивается последний репликативный синтез ДНК. Сетчатая структура хроматина переходит в состояние отдельных длинных, тонких, двойных хромосомных нитей. Теломерными концами эти нити ориентированы в один район ядерной мембраны.

Во время зиготены гомологичные хромосомы начинают сближаться и конъюгировать по типу застежки-молнии, в результате чего образуются биваленты и начинает формироваться синаптонемный комплекс. Хромосомы собираются на одном из полюсов ядра в виде букета.

Стадия пахитены начинается с полного сближения гомологичных хромосом по всей их длине. Каждая нить теперь представляет собой бивалент. Хромосомы утолщаются и укорачиваются, появляются хиазмы. Происходит незначительный репаративный синтез ДНК.

На стадии диплотены доминируют силы отталкивания, вследствие чего образуются хиазмы - физическое проявление происходящего обмена гомологичными участками хромосом. Во время диакинеза за счет сильного укорочения и утолщения хромосом биваленты приобретают форму двойных палочек, гантелей, крестов, восьмерок. Ядрышко и ядерная оболочка исчезают.

Затем наступает метафаза, во время которой хромосомы половых клеток достигают самой высокой степени конденсации.

Из современной литературы известно, что важным фактором, инициирующим выход клеток из G_2 -фазы и вход в фазу деления, является MPF - фактор, активация которого инициирует каскад событий, приводящих к разрушению ядерной мембраны, хромосомной конденсации, линейному выстраиванию парных бивалентов на веретене деления (Chu, Shakes, 2014).

Синтез РНК идет на протяжении всей профазы I мейоза, причем часть синтезируемых информационных молекул запасаются и могут храниться в виде РНП-частиц в течение достаточно большого времени и реализовываться во время спермиогенеза (Захидов, 1998).

Что касается синтеза белков, то в профазе I мейоза синтезируются дополнительно несколько специфических фракций гистонов, которые отличаются от основных ядерных белков, входящих в состав хромосом соматических и сперматогониальных клеток. Важно подчеркнуть, что в отличие от митотических клеток, в мейозе, т.е. в профазе I мейотического деления синтеза ДНК и основных ядерных белков разобщены. Они начинаются

одновременно в прелептотене, но если синтез ДНК полностью завершается в лептотене, то синтез гистонов продолжается вплоть до стадии пахитены (Захидов, 1998).

Итак, после двух делений созревания из каждого сперматоцита I порядка возникает четыре посттелофазные клетки – округлые сперматиды – гаплоидные, фенотипически одинаковые, но генетически неоднородные (Захидов, 1998). С образованием гаплоидных сперматид начинается последний этап развития половых клеток – спермиогенез. У мышей он занимает примерно 14.1 сут (Meistrich, 1986). При этом никаких клеточных делений уже не происходит, но сперматиды проходят через ряд важных этапов созревания, идентификация которых часто важна для определения стадии цикла сперматогенного эпителия. У млекопитающих во время спермиогенеза, т.е. во время трансформации сперматид в спермии, происходят сложные морфологические и биохимические изменения, которые приводят к формированию зрелых мужских гамет. Ядра уменьшаются в размерах и приобретают овальную или удлинённую форму. В этом процессе участвуют микротрубочки, которые формируют вокруг ядра каркас – манжетку, которая определяет видоспецифичную форму ядра. После того, как преобразования в ядре (структурные и биохимические) заканчиваются, манжетка исчезает. Одновременно с этим процессом происходит удаление основных ядерных белков соматического и мейотического типов, но синтезируются новые, спермиоспецифические аргинин - и цистеинбогатые белки, которые комплексируются с молекулой ДНК (Dadoune et al., 2005). Они играют ведущую роль в конденсации и стабилизации гаметического ДНП-комплекса. Эти низкомолекулярные спермиоспецифические, протаминоподобные белки млекопитающих представляют собой высокоосновные белки с молекулярной массой, составляющей половину размера типичных гистонов (5-8кДа). Около 50% их состава занимает аргинин, который обеспечивает прочное взаимодействие с цепью ДНК в одной из бороздок. Также существенную роль играют остатки цистеина. В гаметах плацентарных млекопитающих в результате окисления сульфгидрильных групп цистеина образуется большое количество S-S-связей

между молекулами протаминов. Эти связи обеспечивают большую прочность конденсированным ядрам (Захидов, 1998; Dadoune, 1995; D'Occhio et al., 2007).

По мере продвижения по эпидидимису происходит окончательная конденсация и стабилизация хроматина сперматозоидов. Уменьшение объема спермиев связано не только с удалением воды, но и с продолжающимся образованием огромного количества дисульфидных (S-S) мостиков. В результате образуется структура, которая в 6 раз более конденсирована, чем митотическая хромосома (Ward, Coffey, 1991). Все эти сложные и взаимосвязанные процессы направлены на уменьшение объема спермия, чтобы облегчить проникновение через *zona pellucida*. Ядра спермиев становятся невосприимчивыми к механическим воздействиям, ультразвуку, действию гидролитических ферментов, многих других химических веществ (см. Захидов, 1998; Dadoune, 1995). Словом, сильно конденсированные ядра спермиев млекопитающих настолько прочны, что даже при полном удалении мембраны, они сохраняют форму и объем (Fuentes-Mascorro et al., 2000), однако в этом случае ядерный материал становится более чувствительным к действию веществ, разрушающих дисульфидные мостики (Kvist, 1980).

Хорошо известно, что после проникновения сперматозоида в яйцо в нём разворачиваются процессы, обратные тем, что наблюдались во время спермиогенеза: происходит распад ядерной оболочки, в результате которого хроматин освобождается и контактирует с цитоплазмой яйца (Björndahl, Kvist, 2014). В этих условиях перекрестные дисульфидные связи полностью разрушаются, за этим следует разбухание ядра сперматозоида, деконденсация хроматина и освобождение ДНК от спермиоспецифических основных ядерных белков (Zirkin et al., 1985; Sanchez-Vazquez et al., 1998). Причем потери белков могут быть значительными до 40-60% (Захидов, 1993; Marushige, Marushige, 1975). В результате всех этих преобразований формируется структура, называемая мужским пронуклеусом. Важно отметить (см. Zirkin et al., 1985; Gioia et al., 2005), что нормальный переход ядерного хроматина спермия от сильно конденсированного состояния к состоянию деконденсированному зависит от

степени зрелости ооцита. Так, если ввести спермий в незрелую яйцеклетку процесс деконденсации хроматина не произойдет.

События, связанные с образованием мужского пронуклеуса в ооплазме оплодотворенного яйца, в частности, деконденсация плотно упакованного ядерного хроматина, можно имитировать в условиях *in vitro*, обрабатывая зрелые сперматозоиды в растворах, содержащих детергенты и тиоловые реагенты (см. Zirkin *et al.*, 1985; Dadoune, 1995 и многие другие). В свое время Бэдфорд и др. (Захидов, 1993; Bedford *et al.*, 1973), используя этот подход, обнаружили в эякулятах мужчин большую гетерогенность клеток по степени деконденсации хроматина. Имитация процесса превращения спермия в мужской пронуклеус позволила также визуализировать скрытые структурные аномалии, например, ядерные вакуоли, которые невозможно было увидеть до химических обработок, как на светооптическом, так и на электронномикроскопическом уровнях.

В последние годы одним из решающих параметров при оценке функциональной активности сперматозоидов человека стала способность к деконденсации ядерного хроматина (Irez *et al.*, 2014). Метод деконденсации ядер зрелых сперматозоидов *in vitro* можно использовать при изучении последствий влияния химических и физических агентов, криоконсервации на стабильность структуры ДНП-комплекса, его способности переходить от плотно упакованного состояния к деконденсированному (Захидов, 1993; Huret, 1984; Hernandez-Ochoa *et al.*, 2006; Sreenivasa *et al.*, 2012), а также оценки кариотипа гамет и обнаружения скрытых повреждений генома (Rudak *et al.*, 1978; Young, 1979). В последнем случае это особенно важно, поскольку практика экстракорпорального оплодотворения в той части, когда оценивается качество эякулятов, функциональная активность сперматозоидов, показывает, что примерно у 15% пациентов с бесплодием спермиограмма нормальна (Hammadeh *et al.*, 2001). Каррель и соавт. не исключают в этой связи возможность наличия скрытых нарушений в структуре морфологически нормальных сперматозоидов (Carrel *et al.*, 2003). Юре (Huret, 1984), в свою очередь, изучал в сравнительном плане реакцию свежих и подвергшихся процедуре замораживания-оттаивания эякулированных

сперматозоидов человека в тесте на способность к ядерной деконденсации. Он показал, что после обработки гамет в растворе НДС/EDTA процесс деконденсации и в том и в другом случае протекал примерно одинаково; значительных различий между свежими и криоконсервированными сперматозоидами по способности к деконденсации не было обнаружено, их число составляло, соответственно, 18.76% и 17.14%. В других работах было показано (Захидов и др., 1985), что в образцах семени быков, хранившихся при -196°C в течение 1, 6, 14 лет, после комбинированной обработки детергентом додецилсульфатом Na (SDS) и тиоловым реагентом дитиотрэитолом (ДТТ) число гамет с полностью деконденсированными ядрами составляло в среднем 18%, тогда как из свежеприготовленных эякулятов – 30%. Это может быть связано с организацией гаметического дезоксирибонуклеопротеинового комплекса (ДНП-комплекса) у быков. Это касается, по крайней мере, состава протаминоподобных белков и более высокого содержания дисульфидных перекрестных связей, которые делают хроматин сперматозоидов быков сверхстойчивым к действию различных факторов окружающей среды (Fuentes-Mascorro et al., 2000; Dadoune, 2005; D'Occihio et al., 2007). Длительное хранение в замороженном состоянии может приводить к сверхконденсации хроматина гамет, как предполагается, за счет окисления дополнительных свободных тиоловых групп.

В одной из работ (Sánchez-vázquez et al., 1996) была изучена кинетика деконденсации ядерного хроматина у мышей, содержащих в своей структуре протамины P1 и P2, и крыс, содержащих высоко стабильный протамин P1. Декомпактизация ядерного материала в мышинных сперматозоидах начинается с периферии и постепенно переходит в деконденсацию, а у крыс механизм иной: деконденсация инициируется в центре ядра, а уже потом распространяется к периферии. Таким образом, во всех исследованиях по деконденсации ядерного хроматина составляются классификационные таблицы и схемы, чтобы микроскопические исследования полученных препаратов не были субъективными, и результаты были интерпретированы верно.

Одновременно с моделированием ДНП-комплекса идет формирование двигательного аппарата и развитие акросомной системы. Морфологически сформировавшиеся сперматозоиды выходят в просвет семенных канальцев, а затем в эпидидимис, где окончательно «дозревают» биохимически и приобретают двигательную активность и оплодотворяющую способность. Благодаря всем этим структурно-биохимическим изменениям сперматозоиды получают возможность в дальнейшем нормально продвигаться по женским репродуктивным путям и затем проникать в яйцеклетку (Dadoune, 1995; Захидов, 1998).

У мышей и крыс, по теоретическим расчетам, каждая ССК при нормальной ситуации должна дать начало 4096 сперматидам или сперматозоидам (Meistrich, 1986). Однако так не бывает, потому что в семенниках почти всех изученных организмов наблюдается значительная дегенерация половых клеток (Данилова, 1978; Рузен-Ранге, 1980; Luetjens et al., 2005). Гибель клеток чаще всего происходит на стадиях размножения сперматогониев и мейоза и в меньшей степени во время трансформации сперматид в сперматозоиды. В настоящее время есть два предположения о том, почему происходят большие клеточные потери в семенниках: дегенерация - это механизм, с помощью которого элиминируются клетки с тяжелыми хромосомными аномалиями или механизм, который работает против избыточности. Важную роль в этой связи могут играть клетки Сертоли, фагоцитирующие "лишние" сперматогенные клетки.

В семенниках половозрелых млекопитающих митотически инертные, высокодифференцированные КС, располагаются вдоль базальной мембраны семенных канальцев. КС участвуют в гормональной регуляции сперматогенеза, участвуют в формировании ниши для сперматогониальных стволовых клеток (ССК), выполняют опорные и трофические функции. Функционирование КС регулируется как половыми клетками, так и эндокринными факторами (Габаева, 1982; Райцина, 1985 б).

Клетки Лейдига – стероидпродуцирующие клетки, локализующиеся в интерстициальной ткани семенника вокруг капилляров. Основная функция клеток Лейдига – синтез тестостерона, необходимого как для поддержания

сперматогенеза, так и для общей дифференцировки организма по мужскому типу (см. Райцина, 1985 в; Haider, 2004).

В заключении следует подчеркнуть, что семенники млекопитающих – это сложная многокомпонентная структура, реагирующая на различные, даже самые незначительные изменения внутренней среды организма, и в то же время способная эффективно поддерживать процесс развития мужских половых клеток при самых неблагоприятных ситуациях. Регенеративные потенции этой структуры велики и еще не до конца изучены (Ramm et al., 2014). Для их исследования разрабатываются модели повреждающих воздействий, активирующие разные источники и пути регенерации.

I.2. Клетки Сертоли

Клетки Сертоли – единственные соматические клетки, непосредственно контактирующие с половыми. В большинстве КС развиваются из целомического эпителия мозговых тяжей и имеют светлую цитоплазму. Меньшая часть является производной эпителия канальцев первичной почки и имеет темную цитоплазму. Несмотря на то, что этот тип клеток относительно всех клеток семенника составляет только 8% у взрослых животных, роль их в сперматогенезе велика и до сих пор до конца не изучена (Bellve, 1998; Sharpe et al., 2003; Lucas et al., 2014). Они отвечают за компартментализацию семенных канальцев (Габаева, 1982; Райцина, 1985 а; Griswold, 1998), образование гемато-тестикулярного барьера (Cheng, Mruk, 2002; Ghabriel et al., 2002; Lui et al., 2003; Mruk, Cheng, 2004; Siu, Cheng, 2004), формирование ниш стволовых клеток (Chiarini-Garcia et al., 2001, 2003), поддержание дифференцировки половых клеток путем выработки различных факторов (Griswold, 1995; Weinbauer, Wessels, 1999; Huleihel, Lunenfeld, 2004), регуляцию числа и пролиферации половых клеток (Boekelheide et al., 1998; Lee et al., 1997, 1999; Woolweridge et al., 1999; Ohta et al., 2000; Sette et

al., 2000; Koji, Hishikawa, 2003), обеспечение их движения из базального в адлюминальный компартмент, а также спермиацию (Mruk, Cheng, 2004), удаление гибнущих половых клеток (Kawasaki et al., 2002; Maeda et al., 2002; Nakanishi, Shiratsuchi, 2004) и др. Особо необходимо отметить роль КС в создании гемато-тестикулярного барьера, обеспечивающего селективный транспорт веществ к развивающимся половым клеткам и защищающего их от различных вредных воздействий (Габаева, 1982; Райцина, 1982). Этот барьер образован эндотелиальными клетками кровеносных и лимфатических сосудов, перитубулярными миоидными клетками, окружающими семенные каналцы снаружи и КС, соединенными между собой сложной системой плотных контактов (Габаева, 1982; Райцина, 1982; Bart et al., 2002; Cheng, Mruk, 2002; Lui et al., 2003; Mruk, Cheng, 2004). Показано, что клетки, образующие гемато-тестикулярный барьер, экспрессируют гены, обеспечивающие резистентность ко множественным лекарственным препаратам (multidrug resistance genes) (Melaine et al., 2002; Perek, Denoer, 2002; Fromm, 2004).

Еще одной «барьерной» функцией КС является защита мейотических и постмейотических клеток от контакта с клетками иммунной системы. Этот процесс обеспечивается двумя независимыми механизмами: во-первых, плотные контакты, изолирующие эти половые клетки от остальной части семенника, специфически пропускают в адлюминальный компартмент только сперматоциты на стадии прелептотены-лептотены и не пропускают никакие другие клетки, в том числе и лейкоциты (Mruk, Cheng, 2004). Нарушение гематотестикулярного барьера на уровне плотных контактов между КС приводит к аутоиммунному заболеванию и деструкции семенных каналцев (Lee et al., 1999). Во-вторых, КС способны инициировать в цитотоксических лимфоцитах программу клеточной гибели через Fas зависимый сигнальный путь (Filippini et al., 2001). КС и половые клетки соединены друг с другом различными контактами: заякоривающими (anchoring junctions), адгезивными (adherens junctions) и щелевыми (gap junctions). Функция первых двух типов контактов заключается в основном в прикреплении половых клеток к КС и обеспечение их перемещения из базального компартмента

в адлюминальный, они играют решающую роль в закреплении развивающихся сперматид и отделении созревших спермиев. Через щелевые контакты происходит обмен небольшими молекулами и ионами между КС и половыми клетками (Griswold, 1995; Mruk, Cheng, 2004). Гибель КС – начало краха всей системы развития мужского полового компартмента (Захидов, 1998; de Rooij, Russell, 2000; Chiarini-Garcia, 2003; Juul et al., 2014).

Регуляция сперматогенеза основными половыми гормонами происходит опосредованно через КС. В препубертатном периоде ФСГ (фолликулостимулирующий гормон) стимулирует пролиферацию КС. ФСГ тормозит процесс созревания этих клеток, но не блокирует его полностью (Heckert, Griswold, 2002). Во взрослом состоянии ФСГ регулирует синтез SCF (фактор стволовой клетки), при снижении уровня ФСГ в крови экспрессия этого фактора, необходимого для поддержания пролиферации сперматогониев, уменьшается. Установлено, что содержание ФСГ в плазме крови постоянно в течение сперматогенного цикла, а изменяется число рецепторов к нему на поверхности КС: у крыс, например, оно достигает максимума на XIII–II стадиях, а минимума – на VII–VIII стадиях сперматогенного цикла (подробнее о стадиях сперматогенного эпителия см. Walker, Cheng, 2005). ЛГ (лютеинизирующий гормон) оказывает влияние на КС посредством регуляции синтеза тестостерона клетками Лейдига. Тестостерон поддерживает пролиферацию сперматогониев, а также обеспечивает прохождение мейотического деления (Print, Loveland, 2000). В течение цикла изменяется форма КС, площадь ее соприкосновения с базальной мембраной, форма и положение ядра, количество и соотношение различных органелл. Так, при погружении сперматид в цитоплазму, ядро занимает базальное положение и имеет максимальный объем, а во время спермиации занимает апикальное положение и гораздо меньше в объеме. У большинства животных процесс спермиации сопровождается потерей большей части цитоплазмы КС, в результате чего они сильно уменьшаются в объеме (Габаева, 1982). Одновременно изменяется и экспрессия специфических белков. Так, например, гены антимюллера гормона (АМГ), GATA 4 и цитокератина-18 специфически

экспрессируются во время пролиферативной фазы КС (Sharpe et al., 2003). Уровень экспрессии АМГ снижается к моменту вступления половых клеток в мейоз (Rey et al., 2003), экспрессия GATA 4 достигает максимума на 1 - 14 дни постнатального развития и затем снижается (Viger et al., 1998; Ketola et al., 1999). Он также экспрессируется в клетках Лейдига. Надежным маркером недифференцированных КС является цитокератин-18 (Paranko et al., 1986). В недифференцированных и дифференцированных КС специфически выявляются транскрипционные факторы Sox-9 и Wilms tumor 1 (Gao et al., 2006), steroidogenic factor 1 (Sekido, Lovell-Badge, 2008), а также ФСТГ-рецептор и vimentin (Paranko et al., 1986).

Принято считать, что у взрослых животных КС представляют собой терминально дифференцированную, стабильную клеточную популяцию (у крыс и мышей их пролиферация заканчивается примерно к 15 сут постнатального развития) (Lucas et al., 2014). Тем не менее, возможность пролиферации этих клеток была выявлена при определенных условиях. Известно, что за дифференцировку КС и выход их из клеточного цикла ответственны транскрипционные факторы семейства HLH имеющие основной домен Helix-Loop-Helix и ДНК связывающий домен (Chaudhary et al., 1997). В недавнем исследовании было показано, что белки ID1 и ID2 (то же относящиеся к семейству HLH белков) способны связывать HLH белки с образованием неактивных димеров (Chaudhary et al., 2005), а избыточная экспрессия этих белков вызывает пролиферацию КС в условиях *in vitro* и частичную потерю ими дифференцированного состояния, выражающуюся в уменьшении экспрессии множества специфичных для зрелых КС белков. В другом исследовании (Zhang et al., 2006) было показано, что кратковременное нагревание семенников взрослых обезьян при температуре 43°C приводит к распаду контактов между КС и между ними и половыми клетками, дедифференцировке КС, маркируемой экспрессией цитокератина - 18. При этом пролиферация КС в результате теплового шока имела временный характер. Впоследствии клетки снова дифференцировались и продолжали нормально функционировать. Возможность деления КС была

показана также при индуцированном химическом мутагенезе и у ускоренно стареющих мышей линий SAM (Захидов и др., 1995; Гордеева и др., 2001) и врожденном крипторхизме (Zhang et al., 2004). Таким образом, можно заключить, что дифференцировка КС не является терминальной, как например, у нейронов, а при определенных условиях они способны вступать в пролиферацию, что, по-видимому, имеет важное значение для обновления данной клеточной популяции и обеспечения устойчивости всей сперматогенной системы к различным внешним и внутренним факторам (Tarulli et al., 2012).

В норме у взрослых животных абсолютное большинство КС в популяции имеет одно ядрышко, окруженное двумя, реже тремя-четырьмя гетерохроматиновыми глыбками (Guttenbach et al., 1996). Хотя в популяции встречаются клетки и с одной, тремя и более глыбками. Это зависит от линии мышей, то есть особенностей организации генетического аппарата, от возраста животного и изменяется при воздействиях; но в любом случае является отражением изменения метаболической активности клетки. Для зрелых КС мыши характерен нуклеонемный тип единственного ядрышка. Иногда встречаются клетки содержащие микроядрышки но они, скорее всего, не активны (Hernandez-Verdun et al., 1980). В эмбриональном развитии, а также в препубертатный период, когда еще происходит деление КС, можно обнаружить клетки с более чем одним ядрышком, что является следствием их пролиферации и отчетливым признаком недифференцированного состояния КС (Myers et al., 2005).

Согласно современным представлениям об организации интерфазного ядра, его следует рассматривать как динамичную, высококомпартиментализованную структуру, единицей организации которой является хромосомная территория. Организация и изменение взаиморасположения хромосомных территорий - важнейший фактор в контроле за экспрессией генов (Tamaru, 2010). Хорошо известно, что ядерный хроматин делится на эухроматин (транскрипционно активный) и гетерохроматин (неактивный). Последний во многих интерфазных ядрах при специфическом окрашивании выявляется в виде глыбок (хромоцентров), изменение размера и расположения которых в ядре

свидетельствует об изменении его активности. Чаще хромоцентры расположены около ядерной мембраны или в околядрышковой зоне. Модификация пространственной организации хроматина регулируется эпигенетически (Yoshioka et al., 2009; Andrey et al., 2010; Beisel, Paro, 2011).

В свою очередь в результате интенсивных исследований последних 20 лет изменился и взгляд на функции ядрышка (Boisvert et al., 2007). Доказано, что ядрышко многофункционально: вовлечено во множество клеточных процессов (продукция определенных мРНК, тРНК, мяРНК), является местом локализации около 500 белков регуляторов (Andersen et al., 2005; Scott et al., 2011), в том числе пролиферации, апоптоза и старения (Hernandez-Verdun, 2006; Lo et al., 2006; Boisvert et al., 2007). Роль ядрышка – предотвращение доступа к мишеням. Таким образом, обосновано, что количественно – основная функции ядрышка – синтез рРНК и биогенез рибосом, но для обеспечения внутриклеточных регуляций важнее его роль «изолятора» регуляторных белков.

Часть белков ядрышка, вовлеченных в синтез рРНК, специфически и количественно окрашиваются нитратом серебра. Это позволяет использовать окраску нитратом серебра не только для визуализации ядрышек и ядрышковых организаторов хромосом с целью изучения их поведения при изменении функции клетки и в клеточном цикле, но и проводить количественную оценку транскрипционной активности (Маршак и др., 1994).

Простота реакции сделала этот метод привлекательным для медико-биологических исследований в связи с хорошо доказанным свойством ядрышка изменяться практически при любом влиянии на клетки. Ядрышко называют барометром клеточного здоровья. Число ядрышек в клетке определяется активностью и числом специфических локусов хромосом – ядрышковых организаторов, которые чаще всего лежат в районах вторичных перетяжек. Размер ядрышка может варьировать в зависимости от синтетической активности клетки, ее метаболического статуса, но в то же время сам по себе размер ядрышка не является однозначной характеристикой интенсивности белкового синтеза (Челидзе, 1985). Количество ядрышек может быть меньше или равно числу

ядрышковых организаторов, так как после деления клетки часто происходит ассоциация ядрышковых организаторов с образованием функционирующего большого ядрышка. В митозе ядрышко «исчезает»: в профазе митоза происходит дезинтеграция компонентов, хотя при этом белки, входившие в состав ядрышка, обнаруживаются вокруг концов хромосом, несущих ядрышковые организаторы (Wachtler, Stahl, 1993). Таким образом, в анафазе и ранней телофазе можно наблюдать проядрышки, а уже в поздней телофазе происходит ассоциация ядрышковых организаторов, при этом реконструкция ядрышка идет за счет тех белков, что сопутствовали профазным хромосомам (Hernandez-Verdun, Gauntier, 1994).

Итак, изучение ядрышкового аппарата клетки может дать достоверные сведения как о метаболическом состоянии клетки, так и о ее положении в клеточном цикле, о ее пролиферации.

I.3. Биологические эффекты модельного мутагена дипина

В большинстве случаев сперматогенез угнетается тремя группами патологических влияний – химическими, физическими и биологическими. Химическая модель сперматогенеза экспериментально может быть воспроизведена несколькими способами: при введении необходимых веществ в организм, в семенник или при помещении в культуру клеток. В последнее время все более актуальными становятся исследования, которые проводятся не на организменном уровне, а на органном и тканевом, чтобы снять все опосредованные влияния со стороны всего организма (изменения в общем кровотоке, костном мозге, иммунной, гормональной и нервной системах и т.д.). Хотя именно в исследованиях на организменном уровне были выявлены основные закономерности сперматогенного процесса (Захидов, 1993). Для этого химические вещества вводили внутривенно, внутривенно и т.д. Для изучения на

органном и тканевом уровнях лекарственные средства, химические мутагены, инородные тела вводятся непосредственно в изучаемый орган, в данном случае – в семенник (Weinbauer et. al., 1985; Russell et. al., 1987). В связи с этим разрабатываются новые техники введения, подбираются специфически действующие вещества. Интратестикулярные инъекции в последнее время набирают популярность как методический прием химической кастрации (Johnson, Irwig, 2014). Существует несколько способов введения веществ или клеточных суспензий в семенник: через собственно семенные каналы (при этом небольшая часть канальца вытаскивается через разрез белочной оболочки и проводится инъекция), с помощью инъекции через семявыносящий канал. Также можно вводить вещества через сеть семенника (*rete testis*), таким образом, обходя гематотестикулярный барьер (Ogawa et al., 1997). Еще одним приемом является введение в интерстиций, что позволяет изучать защитные функции гематотестикулярного барьера и функциональную активность интерстициальной ткани.

Дипин (тетраэтиленамид-1,4-пиперазиндифосфорной кислоты) – является алкилирующим агентом из класса этилениминов. Он имеет два реакционных центра, и при попадании в клетку может одновременно вступать в реакцию с двумя нуклеофильными центрами, образуя сшивки. С нуклеиновыми кислотами реакция происходит по гидроксильным группам фосфорной кислоты и атому азота в седьмом положении гуанинового остатка в ДНК (Проценко, Булкина, 1985). В организме дипин подвергается превращениям и довольно быстро выводится из организма, поэтому время его действия сильно ограничено. Было показано, что уже через 15-20 мин после внутривенного введения в крови обнаруживается 1.5% от всей введенной концентрации дипина, а через 45 мин – 0,4%. Через 1 ч содержание его в клетках печени и почек составляет 1.1-2.2% (от введенной дозы) и затем падает в течение 4 ч практически до нуля. Наибольшая тропность дипина характерна для печени, почек, легких, тонкого кишечника, эндокринных желез (по убывающей), наименьшая – для мышц, головного мозга, костного мозга, костной и хрящевой тканей (Проценко, Булкина, 1985). Механизм

действия дипина, как и других известных фосфамидов, сводится к нарушению биосинтетических процессов нуклеопротеидного и белкового обмена. Для него характерно образование двунитевых разрывов ДНК, приводящих к хромосомным aberrациям, в результате которых может нарушаться процесс деления клетки и происходит образование микроядер. Таким образом, включаясь во все клетки, дипин поражает в первую очередь активно делящиеся.

Дипин был использован для изучения строения аппарата Гольджи (Сысоева, Онищенко, 2003), особенностей регенерации печени у мышей (Урываева и др., 1979, 1996; Фактор и др., 1979; Урываева, Фактор, 1982; Маршак и др., 1997; Uryvaeva, 1992), а также для выяснения особенностей восстановления кроветворной (Домарацкая и др., 2005) и сперматогенной систем (Захидов, 1993; Кулибин, 2006), относящихся к типу обновляющихся клеточных популяций. Функционирование последних двух систем одинаково основано на постоянном пополнении клетками за счет стволового резерва.

Рассмотрим факты, касающиеся цитотоксических и генотоксических воздействий дипина на сперматогенную систему мышей-гибридов F₁ СВА×С57В1/6 после однократного внутрибрюшинного введения в дозе 30 мг/кг и 60 мг/кг. Количественный анализ сперматогенеза у мышей-гибридов показал, что в независимости от дозы мутагена наибольшую чувствительность к нему проявили клетки сперматогониального компартмента, активно размножающиеся клетки и часть стволовых клеток, а также сперматоциты на стадии средней и поздней пахитены; сперматиды и сперматозоиды оказались менее уязвимыми клетками (Захидов и др., 1994 б, в). Дипин не вызывал необратимого повреждения всех стволовых клеток, о чем говорит постепенное заполнение поврежденных канальцев сперматогенными клетками различных типов на отдаленных сроках фиксации (56, 100 и 180 сут). Важной особенностью ответной реакции сперматогенной системы на массовую гибель сперматогониев и ранних мейотических клеток, явилось усиление пролиферативной активности стволовых сперматогониальных клеток, причем при дозе дипина в 60 мг/кг этот эффект оказался сильнее, чем при дозе в 30 мг/кг. При количественном изучении

популяции высокодифференцированных соматических КС (Захидов и др., 1995) было отмечено атипичное, выходящее за рамки принятых представлений, поведение после мутагенного воздействия. Так, на 14 и 21 сут последействия число этих клеток у мышей после однократного введения дипина в дозе 30 мг/кг статистически достоверно возросло по сравнению с контролем соответственно на 183 и 230%, а на последующих сроках фиксации было близким к контрольному значению. В то же время, дипин в дозе 60 мг/кг оказывал цитотоксическое действие на КС, и их число резко снижалось к 14 сут последействия и медленно восстанавливалось до контрольного уровня только к 100 сут фиксации. Учитывая особую роль КС в развитии сперматогенных клеток и поддержании стволовой ниши, транзиторное увеличение их числа необходимо, по-видимому, для создания условий, способствующих сохранению и пролиферации стволовых сперматогониев и их дифференцировке в сперматозоиды (Захидов и др., 1995; Kiger, Fuller, 2001; Маршак и др., 2002).

Как показал цитогенетический анализ, другим следствием введения дипина, как в дозе 30 мг/кг, так и в дозе 60 мг/кг является увеличение числа генетически aberrантных сперматогониев по сравнению с контролем на всех изученных сроках фиксации, что указывает на длительное сохранение индуцированных дипином мутаций в стволовых сперматогониальных клетках (Захидов и др., 1994 б). Высокую генетическую чувствительность проявили и мейотические клетки, результатом этого явилось большое число округлых сперматид с микроядрами на 3 и 14 сут последействия. В то же время на отдаленных сроках фиксации число округлых сперматид с хромосомными нарушениями у животных опытной группы не отличалось от животных контрольной группы. Этот факт свидетельствует об эффективной работе механизмов отбора генетически aberrантных клеток в сперматогониальном и мейотическом компартментах. Необходимо отметить также, что при дозе дипина в 60 мг/кг число сперматогониев с микроядерными aberrациями на всех изученных сроках было ниже, чем при вдвое меньшей дозе, но все же значительно больше, чем в контроле. Это, по-видимому, связано с

высоким цитотоксическим действием мутагена при высоких дозах и гибелью части аберрантных клеток.

С помощью методов количественной цитохимии в сперматогенных клетках мышей, подвергшихся действию дипина в дозе 30 мг/кг, на 14 и 35 сут фиксации выявлена значительная вариабельность содержания ДНК в округлых и удлиняющихся сперматиде, эпидидимальных спермиях. Кроме того, обнаружен дефицит основных ядерных белков в эпидидимальных спермиях, находившихся на момент воздействия на стадиях ранней профазы I мейоза, либо на промежуточных стадиях спермиогенеза (Захидов и др., 1994 а). Дефицит основных ядерных белков может быть связан как с нарушением синтеза спермиоспецифических гистонов в поздних сперматогониях и пахитенных сперматоцитах, так и с нарушением процессов поэтапной смены соматических гистонов на спермиоспецифические, богатые аргинином и цистеином белки на постмейотических стадиях сперматогенной дифференцировки. В конечном счете, это приводит к нарушению механизмов упаковки ДНК в процессе спермиогенеза, а, следовательно, и к изменению пространственной организации генома сперматозоидов (Sega, Owens, 1983; Захидов, 1993; Захидов и др., 1994 а; Codrington et al., 2004). По современным представлениям, пространственная организация генома, например, взаимное расположение отдельных участков двух соседних хромосом, часто оказывается критичным для наличия или отсутствия экспрессии того или иного гена. Нарушение пространственной упаковки ДНК в процессе спермиогенеза, таким образом, неминуемо приведет к появлению отличий в свойствах постмейотических клеток (Birkhead et al., 2005; Kioussis, 2005; Kimmins, Sassone-Corsi, 2005).

Таким образом, влияние дипина на дифференцировку обновляющихся клеточных популяций проявляется в глубоком и длительном повреждении стволового компартмента, а также клеток формирующих стволовую нишу. В целом же полученные данные о биологических эффектах дипина на различные клеточные системы показывают, что алкилирующие мутагены, такие как дипин, позволяют изучать особенности развития и регенерации как стабильных, так и обновляющихся клеточных систем.

I.4. Методы культивирования сперматогенного эпителия и клеток Сертоли

Культивирование клеток и тканей семенника к настоящему времени получило широкое распространение в различных областях исследований: от клеточной и молекулярной биологии до быстро прогрессирующих прикладных областей биотехнологии.

В соответствии с целями и задачами экспериментальной работы можно выделить два направления культивирования:

- культуры клеток;
- культуры органов и тканей (органные культуры).

Органные культуры используют для изучения закономерностей развития органов и разработки способов сохранения жизнеспособности изолированных органов, предназначенных для трансплантации.

Активно метод органного культивирования семенников стал разрабатываться в 1960-1970 гг. (Steinberger et al., 1964; Steinberger, Steinberger, 1967). По сравнению с клеточным он имеет много преимуществ, так как стволовые клетки находятся в окружении своей ниши, *in situ*, а не *in vitro*, где их свойства неизбежно меняются. Им удалось культивировать ткань семенника молодых крыс, но сперматогенез останавливался на стадии пахитены в мейозе (Steinberger, Steinberger, 1970). При этом они впервые предложили расположить фрагменты ткани семенника на поверхности среды, чтобы иметь возможность управлять уровнем кислорода и подачей питательных веществ, а в качестве субстрата адаптировали среду, разработанную Иэгл (Eagle, 1955; Trowell, 1959). Однако задержку на стадии сперматоцитов в опытах Штайнбергеров преодолеть не удалось. В связи с научным прогрессом в области клеточного культивирования в течение 40 лет эксперименты этих авторов не повторялись. Органная культура использовалась весьма ограниченно, например, для изучения влияния различных

факторов на отдельные клеточные компартменты – стволовой, соматический (Tajima et al., 1995; Zhou, Hutson, 1995; Puglisi et al., 2004).

Только в 2010 году группа японских исследователей культивировала таким же методом сперматогенную ткань, преодолев мейотический арест (Gohbara et al., 2010). В своей работе они использовали все накопленные за последнее время знания в области клеточного и органного культивирования (новые среды, дополнительные питательные факторы и т.д.). Эта модель открыла новые возможности к изучению сперматогенеза *in situ*: были протестированы влияния температуры, состава газовой среды, ростовых факторов. А в марте 2011 года им удалось стабилизировать органную культуру, полученную из фрагментов семенника новорожденных мышей, культивировать ее вплоть до образования сперматозоидов и произвести успешное оплодотворение (Sato et al., 2011). На сегодняшний день разработка методов культивирования мужских гонад считается актуальной проблемой как для решения вопросов биотехнологии, так и для решения задач практического здравоохранения, связанных с лечением мужского бесплодия (Mäkelä et al., 2014; Reda et al., 2014; Reuter et al., 2014). В нашей стране, например, разрабатываются культуральные системы, позволяющие сохранять жизнеспособность мужских половых клеток *in vitro* и оценивать влияние вирусов герпеса на сперматогенез (Брагина и др., 2009; Тюленев и др., 2010).

Работы по изучению поведения КС в культуре начались еще в 70-х годах XX века. Тогда впервые удалось выделить и охарактеризовать КС, поместив их в условия *in vitro* (Kodani, Kodani, 1966). Долгое время культивирование встречалось со многими трудностями; к тому же, как и для многих других клеток свойства КС *in vitro* и *in vivo* сильно различались. Постепенно методы совершенствовались. Так, например, для изучения функциональной активности КС, была разработана система культивирования, где клетки находились в высокополяризованном состоянии, как в семенных каналцах (Janecki, Steinberger, 1986).

Активно подбирались условия успешного культивирования (Hadley et al., 1988). Культура стала удобной моделью для изучения влияния гормонов (ФСГ, тестостерон), различных белковых факторов на КС; для характеристики веществ, выделяемых самими клетками - андроген-связывающий белок, трансферрин, ингибин и многие факторы, поддерживающие стволовость в нише (Louis, Fritz, 1977; Hutson, 1978).

Метаболическая активность КС стала активно исследоваться после внедрения метода совместного культивирования клеток Сертоли с другими типами клеток (Zhang et al., 2008 a; Yu et al., 2009; Fan et al., 2011).

Популяцию клеток Сертоли животных во взрослом состоянии принято считать дифференцированной, стабильной, непролиферирующей (см. Габаева, 1982; Tarulli et al., 2012). В то же время показана их способность к пролиферации при экспериментальных воздействиях (Захидов и др., 1995; Гордеева и др., 2001; Zhang et al., 2004; 2006; Chaudhary et al., 2005). С этой точки зрения культивированию КС уделяют особое внимание. Во многих экспериментах была отмечена небольшая пролиферативная активность КС в культуре, полученной от 20-дневных грызунов (Trivedi et al., 2006). Вопреки тому, что терминальной дифференцировки и остановки делений КС у этих животных достигают уже на 16-17 сут постнатального развития (Vergouwen et al., 1991). В дальнейшем в условиях *in vitro* были изучены многие ростовые факторы, гормоны, влияющие на повышение пролиферативной активности КС (Buzzard et al., 2002). Сейчас уже появилось много работ, показывающих, что у животных КС значительно отличаются на молекулярном уровне от других терминально дифференцированных клеток организма (Ahmed et al., 2007; Ahmed et al., 2009). А в 2010 году была показана пролиферативная активность в культуре КС человека (Franke et al., 2004; Chui et al., 2010).

Показано, что культивированные КС при трансплантации животным донорам вызывают образование семенных канальцев и усиление сперматогенеза. Причем трансплантация культуры КС от эмбрионов оказывала более выраженный эффект, чем аналогичная культура от взрослых животных. Встречаются работы, которые

свидетельствуют о возможности трансплантации культуры КС между разными животными, при этом также отмечалось усиление сперматогенеза. При дальнейшем совершенствовании этих методов их можно будет использовать для восстановления нормального сперматогенеза у пациентов с infertility. (Shinohara et al., 2003).

В настоящее время получил распространение метод совместного культивирования КС и других типов клеток, в том числе сперматогониальных стволовых клеток (Zhang et. al., 2008 a; Yu et. al., 2009; Fan et. al., 2011). При этом способе клетки Сертоли используются в качестве фидерного слоя, имитирующего нишу подобную той, которая формируется на стенках семенных канальцев. Эта методика может быть использована для дальнейшего изучения роли КС в процессе дифференцировки сперматогониальных клеток.

В целом, в последнее время культивированию КС уделяется большое внимание в связи с перспективой их использования в терапии совершенно различных заболеваний. Например, когда КС вводились подопытным крысам, после того как у них искусственно вызывали инфаркт, двигательные функции крыс восстанавливаются заметно лучше. Защитные воздействия, оказываемые КС на нейроны, предполагают использовать и для лечения различных депрессивных расстройств (Loftis, 2011). Активно исследуется и положительное влияние КС на лечение экспериментального диабета у лабораторных животных. (Fallarino et. al., 2009).

Недавно клетки Сертоли были репрограммированы в индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSc) и показаны их преимущества перед остальными популяциями клеток, используемых для этих технологий (Wang et al., 2014).

Таким образом, уникальные свойства КС привлекают внимание исследователей, работающих в различных областях. Перспективность развития этого направления очевидна.

I.5. Трансплантации под капсулу почки

Закладка семенников в эмбриогенезе и сперматогенез в дальнейшем регулируются большим числом факторов, многие из которых еще не изучены. Сложность организации сперматогенного эпителия ограничивает возможности его изучения в условиях *in vitro*. Конец XX века отмечен появлением разнообразных альтернативных методик и новых подходов к исследованию этих процессов (Arregui, Dobrinski, 2014). Модель трансплантации сперматогониальных стволовых клеток, впервые выполненная на грызунах, расширила знания, как в области биологии сперматогенеза, так и биологии стволовых клеток (Brinster, 2007). Сейчас эта техника успешно применима не только к грызунам, но и к свиньям (Honaramooz et al., 2002 a), крупному рогатому скоту (Honaramooz et al., 2003), козам (Izadyar et al., 2003), приматам (Schlatt et al., 1999), овцам (Rodriguez-Sosa et al., 2006) и собакам (Kim et al., 2008). Но так как экспериментальная работа с вышеперечисленными животными очень дорогостоящая и трудоемкая, стала внедряться техника ксенотрансплантации ССК от интересующего донора в семенники мышей. Однако, в таком случае, сперматогенез останавливался на стадии делений сперматогониев. Выяснилось, что это связано с неприемлимым для трансплантантов микроокружением (Dobrinski et al., 2000; Nagano et al., 2001, 2002; Oatley et al., 2011). Следующим шагом было проведение трансплантации ССК вместе с соматическими клетками (Honaramooz et al., 2002 b). Так было показано, что изолированные соматические клетки с ССК, полученные от новорожденных мышей, при трансплантации под кожу спины дают развитие функционально активной сперматогенной ткани, адекватно реагирующей на введение гормонов, регулирующих сперматогенный процесс. (Honaramooz et al., 2007; Kita et al., 2007). Затем со сперматозоидами, полученными из трансплантатов, проводилась процедура ИКСИ, в результате чего, получали жизнеспособных эмбрионов, а затем и потомство (Honaramooz et al., 2002 a, 2002 b, 2004, 2008; Schlatt et al., 2003).

В целом, техника эктопических трансплантаций открывает широкие возможности изучения свойств и потенций ткани и отдельных клеток, входящих в ее состав (Matoba, Ogura, 2011).

Впервые пересадка фрагмента ткани семенника была произведена в 1924 году. С этого момента проведено огромное количество ауто-, алло- и ксенотрансплантаций, накоплено много данных (Gosden, Aubard, 1996). Было установлено, что основные факторы, влияющие на результат трансплантации, - это возраст и стадия становления сперматогенного процесса донора (Oatley et al., 2005), а также возраст, подготовленность и, в случае ксенотрансплантаций, видовая принадлежность реципиента (Ogawa et al., 1999). От этого зависит и время после трансплантации, через которое сперматогенез станет полноценным; оно может сильно варьировать от 1-2 до 8-9 месяцев. Ткани от взрослых животных обладают довольно скудными потенциями к восстановлению сперматогенеза, которые к тому же ослабевают с увеличением возраста донора (Schlatt et al., 2002; Geens et al., 2006; Kim et al., 2007; Arregui et al., 2008 b). Хотя есть успешные эксперименты с использованием ткани взрослых животных. (Schlatt et al., 2002; Geens et al., 2006). Есть сведения о способности выживать после трансплантации иммунодефицитным мышам ткани семенников от взрослого человека (Schlatt et al., 2006).

Трансплантированные фрагменты семенников новорожденных животных всегда хорошо приживаются и развиваются. Критическим в данном случае является момент первого вступления половых клеток в мейоз, так как одновременно с этим КС окончательно дифференцируются и прекращают делиться (Meachem et al., 2005). Реципиентами являются чаще всего иммунодефицитные мыши, которых до или непосредственно во время трансплантации кастрируют, чтобы избежать гормонального подавления развития трансплантата со стороны реципиента (Gosden, Aubard, 1996). Хотя не так давно было показано, что это не является обязательным условием (Shinohara et al., 2002; Dufour et al., 2003).

Чаще всего трансплантации проводят под кожу спины, так как это менее травматично. Однако, нехарактерный для сперматогенеза температурный режим и низкая степень васкуляризации оказывают небольшое тормозящее влияние на развитие эксплантата. Проводя эктопические трансплантации на крысах, в 1938 году Тернер показал, что наиболее удачным микроокружением для развития сперматогенного эпителия является передняя камера глаза. Но эта методика не нашла широкого применения из-за технической сложности и невозможности трансплантировать большие фрагменты ткани (Turner, 1938).

Большими преимуществами обладает метод трансплантации под почечную капсулу, который широко применяется для различных тканей. Эта зона является иммунопривилегированной и одной из наиболее васкуляризованных во всем организме. Благодаря этому, уже через несколько дней трансплантированная ткань уже может отвечать на гормональные воздействия со стороны реципиента.

Границы экспериментальных манипуляций расширились благодаря освоению техники пересадки не целого фрагмента семенника, а изолированных клеток. Появилась возможность изучения поведения отдельных клеточных типов в эктопических условиях. Данная методика уже активно применяется на свиньях (Honaramooz et al., 2007), грызунах (Kita et al., 2007), овцах (Arregui et al., 2008 a). Формирование ткани сперматогенного эпителия из отдельных клеток было отмечено группой канадских исследователей, которые трансплантировали вместе с панкреатическими островками КС, используя их иммуносупрессорные свойства. В результате они наблюдали формирование семенных канальцев, состоящих из КС и перитубулярных мышечных клеток (Kin et al., 2002). Структуры подобного рода образовывались и при трансплантации изолированных клеток или выращенных в культуре под почечную капсулу (Dufour et al., 2002; Gassei et al., 2006). Вскоре после продолжительного эксперимента на свиньях, было показано: если эктопически трансплантировать микросферы, полученные путем центрифугирования суспензии клеток семенника новорожденного животного (состав: 50% клеток Сертоли, 5% стволовых клеток, 20% перитубулярных мышечных клеток и 10% клеток Лейдига), то через 30 недель новообразованная

ткань начинает функционировать, и в 10% канальцев процесс доходит до образования сперматозоидов (Honaramooz et al., 2007). При этом, уже через несколько дней начинаются процессы морфогенеза, появляются зачатки семенных тяжей, напоминающие таковые в эмбриогенезе; а через 4 недели они преобразуются в канальцы, одновременно с этим стволовые клетки, содержащиеся в канальцах, начинают мигрировать к базальной мембране и вступать на путь дифференцировки. Подобного рода эксперимент был поставлен на мышах, которым трансплантировали клетки от новорожденного животного, меченные GFP. Сперматогенез доходил до стадии округлых сперматид, которые применяли в процедуре ИКСИ и получали потомство, несущее GFP-маркер (Kita et al., 2007).

Активно функционирующий сперматогенный эпителий образовывался и после эктопической трансплантации примордиальных стволовых клеток, полученных из эмбриональных гонад мышей на 12.5 сутки после оплодотворения, то есть после того как произошла дифференцировка гонад по мужскому типу (Matoba, Ogura, 2011).

Что касается исследований восстановительных потенций суспензии клеток, полученной от взрослых животных, то таких работ пока немного. Достоверно показано, что, как и в случае с тканью семенника способность к развитию значительно падает с возрастом донора, но все же не исчезает совсем. Недавние исследования продемонстрировали, что суспензия клеток, выделенная из семенников 2-х недельных ягнят, после трансплантации под кожу спины иммунодефицитных мышей, через 4 недели способна образовывать канальцы. Но лишь через 35 недель в семенных канальцах начинают обнаруживаться пахитенные сперматоциты, а полностью сперматогенез восстанавливается к 40 неделе (Arregui et al., 2008 a).

Способность реконструировать семенные канальцы в эктопических условиях принадлежит во многом КС. Это было доказано при трансплантации изолированных КС от новорожденных крыс иммунодефицитным мышам (Gassei et al., 2008). Через 4 нед восстанавливалась типичная архитектура семенника.

Другая группа исследователей подтвердила эти результаты, трансплантируя КС быков под кожу спины и под белочную оболочку семенника (Zhang et al., 2008 b). При этом через 2 мес в эксплантатах были обнаружены даже половые клетки. Аналогичные структуры образуются и при культивировании недифференцированных КС крыс во внеклеточном матрикс-геле (Gassei et al., 2006). А после подсадки новообразованных канальцеподобных структур под кожу спины иммунодефицитных мышей через некоторое время они преобразуются в семенные каналцы. Но в этом эксперименте дифференцировку половых клеток не наблюдали.

Возможность подобных манипуляций с половыми и соматическими клетками семенника открыла новые пути для понимания основных закономерностей развития сперматогенного эпителия и новые перспективы для последующих биотехнологических исследований.

1.6. Биологические эффекты наночастиц

Прогресс в области нанотехнологии обещает продолжить глубокие перемены в структуре окружающего мира. Нельзя исключить того, что в природу поступят новые специфические раздражители, обладающие цито – и генотоксической активностью. Их действие на биологические системы непредсказуемы. В этой связи следует добиваться тщательного изучения эффектов наночастиц на генетические и клеточные структуры. Тем более что в литературе уже появляются сообщения о вредных влияниях наноматериалов на живые организмы (Евдокимов, 2008; Евдокимов и др., 2010; Iavicoli et al., 2013). Как известно, наночастицы демонстрируют уникальные физические, физико-химические свойства, принципиально отличающие их от соответствующих микро- и макроскопических объектов. Наночастицы обладают высокой проникающей способностью, для них практически нет барьеров (Miresmaeili et al.,

2013). Двигаясь внутри клеток по каким-то своим специфическим «траекториям», они способны порождать множество свободных радикалов и активных мутагенных молекул, возбужденные состояния, подавлять каталитические центры в ферментах и, как следствие, усиливать генетическую нестабильность. Обнаружение и инвентаризация наночастиц, обладающих гено- и цитотоксичностью - одна из самых актуальных задач экспериментальной нанотоксикологии (Захидов, 2010 а, б).

Химически активные наночастицы могут образовывать прочные связи с биомолекулами (например, белками или ДНК), повреждая их, "выключая" или, наоборот, способствуя их повышенной активности. Еще один вариант отрицательного воздействия - катализ вредных для организма химических реакций. Даже если "подозреваемые" наночастицы окажутся безвредными, оказывать пагубное влияние могут содержащиеся в них примеси, которые очень трудно обнаружить (примесные вещества также могут образовывать с наночастицами прочные связи). В противоположность высоко активным существуют химически инертные наночастицы. Они особенно интересуют медиков, которые с их помощью рассчитывают решить проблему доставки лекарств через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) (Khlebtsov, Dykman, 2011). ГЭБ представляет собой дополнительный слой клеток, называемых глиальными, в капиллярах большинства отделов головного мозга. ГЭБ защищает мозг от проникновения вредных веществ, и он же препятствует попаданию туда лекарств или веществ, необходимых для диагностических процедур. Недавно было показано, что если "упаковать" лекарства в оболочку из определенных материалов, то полученные наночастицы способны проникать через ГЭБ. Противники внедрения нанотехнологий указывают, что если в такую оболочку поместить не полезные вещества, а яды, то наночастицы могут стать идеальным орудием убийства.

Важным направлением в области экспериментальной нанотоксикологии должны стать исследования воздействия нанокорпускул и их комплексов с другими молекулами на генетические структуры и клетки зародышевого пути,

поскольку именно половые клетки, их наследственный аппарат связывают поколения между собой, гарантируя непрерывность жизненного процесса (Захидов, 2010 а; Lan, Yang, 2014; Thakur et al., 2014). Ведь наночастицы в силу своих ультрамалых размеров и уникальных физико-химических свойств, заметно отличающихся от «массивного» образца тех же материалов, способны легко проникать внутрь клетки и ядра, интегрироваться с молекулой ДНК, создавая благоприятные предпосылки для индукции мутаций, которые, возникая, в том числе и в половых клетках, могут нарушать процессы оплодотворения и эмбриогенеза.

В связи с открывающимися большими перспективами использования наночастиц золота в промышленной практике, медицине, научных исследованиях поднимается вопрос о том, обладают ли наночастицы Au токсическими эффектами (Лысцов, Мурзин, 2007; Сулейманова, 2009). Судя по некоторым имеющимся в литературе данным, информация относительно биологического действия наночастиц золота носит противоречивый характер (Yoshida et al., 2007; Исламов, 2009) .

В последние годы были получены важные результаты при изучении действия наночастиц золота на зрелые сперматозоиды эукариотических организмов (Wiwanitkit et al., 2009; Moretti et al., 2012; Taylor et al., 2012; Tiedemann et al., 2014). Однако отметим, что данных по изучению последствий влияния наночастиц Au на развивающиеся мужские половые клетки млекопитающих отсутствуют. исследованию способности наночастиц золота проникать в клетки млекопитающих, в том числе, в сперматозоиды, и различные клеточные структуры уделяется в последние годы все большее внимание (Murphy et al., 2008; Wiwanitkit et al., 2009; Johnston et al., 2010; Moretti et al., 2012; Boyoglu, et al., 2013; Taylor et al., 2013; Dykman, et al., 2014; Tiedemann et al.; 2014). Полученные результаты свидетельствуют о том, что эта способность определяется, в первую очередь, размером и химией поверхности наночастиц; кроме того, она может зависеть и от типа клеток. Показано, в частности (Moretti et al., 2012), что клеточная мембрана сперматозоидов человека оказывается проницаемой даже для

достаточно крупных наночастиц Au (со средним диаметром около 50 нм), модифицированных биологически инертным полимером – поливинилпирролидоном. В то же время, полученные лазерной абляцией наночастицы Au гораздо меньшего размера (со средним диаметром 7–10 нм), стабилизированные электростатически или за счет адсорбции на их поверхности молекул олигонуклеотида, не проникали внутрь бычьих сперматозоидов (Taylor et al., 2014). На наш взгляд, этот результат напрямую обусловлен химией поверхности наночастиц. Действительно, электростатически стабилизированные наночастицы в среде с высокой ионной силой, каковой обычно является культуральная жидкость, могут быстро коагулировать с образованием больших агрегатов, особенно, если заряд наночастиц не слишком велик. Именно эта ситуация имела место в работе Taylor с сотр. (Taylor et al., 2014). Клеточная интернализация таких агрегатов или вообще невозможна, или, по крайней мере, очень сильно затруднена (Albanese, et al. 2011). В то же время, в случае наночастиц Au, стабилизированных олигонуклеотидом, очевидно, имело место сильное специфическое взаимодействие его молекул с белками клеточной мембраны, что также препятствует проникновению частиц в клетку. Отметим, что наши наночастицы, хотя также были стабилизированы по электростатическому механизму, практически не агрегировали в физиологическом растворе в течение, по крайней мере, нескольких часов. Это, в первую очередь, было обусловлено их высоким зарядом (дзета-потенциал частиц был равен примерно -40 мВ).

II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

II.1. Постановка экспериментов

В работе были использованы самцы мышей-гибридов СВА×С57BL/6 в возрасте 2-3 мес. и самцы мышей линии С57BL/6 двух возрастных групп: новорожденные (3-дн.) и половозрелые (2-3 мес.). Животные содержались и размножались в стандартных условиях вивария (температура воздуха 18-22°C, световой день 12 ч), получая пищу и воду *ad libitum*.

В исследованиях мутагенного действия дипина использовали 45 половозрелых мышей-гибридов СВА×С57BL/6. Подопытным животным (4-6 мышей на каждом сроке фиксации) однократно в интерстиций семенника вводили 15 мкл раствора дипина, в концентрации 0,45 мг/мл (разбавление в физиологическом растворе). Контрольным животным (3-5 мышей на каждом сроке фиксации) однократно в интерстиций инъецировали 15 мкл физиологического раствора. Введение осуществлялось стеклянным капилляром, делали проколы в четырех местах через белочную оболочку, чтобы раствор равномерно распределился по всему объему семенника. Для наркотизирования на время операции использовался хлорал гидрат из расчета 400 мг/кг веса животного. Забой контрольных и опытных животных производили через 7, 14, 35, 56 и 100 сут после инъекции путем дислокации шейных позвонков, вскрывали и извлекали семенники с эпидидимисами. Проводили количественный, морфогистологический, цитогенетические анализы, а также анализ на способность к деконденсации ядерного хроматина эпидидимальных спермиев *in vitro*.

Изучение влияния наночастиц золота на сперматогенез проводили на мышах-гибридах СВА×С57BL/6 (16 животных). Подопытным животным ежедневно четыре раза внутрибрюшинно вводили по 0,2 мл суспензии наночастиц золота в концентрации 1×10^{15} частиц на мл (ч/мл), контрольной группе животных вводили 0,2 мл физиологического раствора. Забой контрольных и подопытных животных

производили через 14 и 56 сут. В этой части работы было использовано 14 животных.

В опытах по культивированию КС и трансплантации сперматогенного эпителия под почечную капсулу использовали 30 мышей линии C57BL/6. При трансплантациях через разрез брюшной стенки выводили поочередно почки, делали поверхностный разрез капсулы почки и с помощью пинцета помещали туда кусочки семенника ($\sim 8 \text{ мм}^3$) или отдельные канальцы ($\sim 8 \text{ мм}^3$). Для трансплантации клеток семенника, готовили суспензию, в которой концентрация клеток составляла 10^7 – 10^8 кл./мл. Затем клетки инъецировали в подпочечную капсулу с помощью стеклянного капилляра. Клетки для трансплантации выделялись из семенников мышей-доноров той же линии двух возрастных групп: половозрелые самцы 2,5 - 3 месяцев и новорожденные 3-дневные самцы.

В первой серии экспериментов по трансплантации кусочки семенника, отдельные семенные канальцы или суспензию клеток семенника новорожденных мышат помещали под капсулу почки половозрелым самцам.

Во второй серии трансплантировали кусочки семенника, отдельные семенные канальцы или суспензию клеток семенника под капсулу почки половозрелым самцам.

В последней серии опыта половозрелым самцам под капсулу почки трансплантировали отдельные семенные канальцы от взрослых животных, которым за 14 сут до этого внутрибрюшинно был введен дипин в концентрации 30 мг/кг или культуру КС взрослых животных (12 суток *in vitro*).

Для наркотизирования использовался хлорал гидрат из расчета 400 мг/кг веса животного.

II.2. Получение суспензии клеток семенника

Семенники извлекали и помещали в раствор Хэнкса (без кальция и магния), удаляли с них белочную оболочку и в таком виде переносили на 5 мин в раствор с антибиотиками который приготавливали в стерильных условиях. Для этого в

чашку Петри наливали раствор Хэнкса и добавляли 20 мкл/мл (1:50) пенициллин/стрептомицина (Пан-Эко). Затем пинцетами аккуратно разделяли семенники на отдельные каналцы, переносили их в раствор Хэнкса, содержащий коллагеназу IV типа (1 мг/1.5 мл) и 0,04% ДНКазу I (все Sigma) и инкубировали при +37°C 15 мин. После инкубации каналцы промывали 2–3 раза Хэнксом для удаления клеток интерстициальной ткани. Затем добавляли к каналцам раствор трипсина (0.25%) с 1 мМ ЭДТА (Sigma) и инкубировали при +37°C 15 мин. После этого для остановки действия трипсина в раствор добавляли 5% FBS (Fetal Bovine Serum, Sigma), затем промывали каналцы 2 раза Хэнксом (каждый раз дожидаясь их осаждения). После этого отмывали средой для культивирования клеток Сертоли (состав среды: F12:MEM (Sigma; SAFC bioscience, соответственно), 1:1; pH 7.0–7.2). Затем клетки пипетировали и фильтровали через «грубый» фильтр (~200–300 мкм), а затем через фильтр с размером пор 40 мкм, промывая Хэнксом или средой. Подсчитывали число клеток в камере Горяева и разводили осадок клеток с таким расчетом, чтобы концентрация клеток в суспензии составила 10^7 – 10^8 кл./мл. Клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 400 g (2000 об./мин), после чего сливали супернатант, а осадок помещали в среду для трансплантации клеток (12 (среда MEM/F12) : 5 (10% FBS) : 2 (ДНКазы I, 2 мг/мл) : 1 (0.4%-ный раствор трипанового синего).

III.3. Культивирование клеток Сертоли

Культивирование КС осуществлялось в боксе. Сначала производили выделение клеток семенника в суспензию (см. п. II.2.). После подсчета числа клеток в камере Горяева (см.), непосредственно перед посадкой клеток в культуру, в нее добавляли антибиотики и сыворотку.

$$V \text{ суспензии (мл)} = \frac{(\text{число клеток}) \times 0.21 \text{ мл/см}^2}{180000 \text{ клеток/см}^2}.$$

Состав среды = 5% FBS + 2% Пенициллин/Стрептомицин + 0.05% Амфотерицин + 93% MEM:F12).

Полученную суспензию клеток тщательно пипетировали, а затем распределяли по чашкам Петри, на дне которых лежали культуральные стекла диаметром 10 и 24 мм, исходя из концентрации клеток: 180000 клеток/см². Инкубировали при +37°C (5% CO₂) и через 3 ч производили смену половины среды. Через 24 ч после посадки клеток в культуру прикрепившиеся клетки Сертоли отмывали от неприкрепившихся половых клеток, а также переносили клетки в среду, содержащую 1% сыворотки (FBS). Затем промывали культуру раствором Хенкса (+37°C) 2 раза. После последней отмывки добавляли среду (+37°C) и переносили культуру обратно в инкубатор. В дальнейшем смену среды осуществляли через день. Культуру фиксировали на 3, 6, 9, 12 и 20-е сут; клетки анализировали с помощью гистохимических методов: иммуноцитохимия, реакция Фельгена, серебрение белков ядрышка.

II.4. Фиксация материала, приготовление и окрашивание препаратов

Для гистологического анализа семенники и почки фиксировали в растворе Буэна или mDf (модифицированный фиксатор Дэвидсона) в течение 4 сут. Приготавливали парафиновые срезы толщиной 7 мкм (микротом «Рейхарт-2030», Германия), которые окрашивали гематоксилином-эозином по методу Караччи, заключали в канадский бальзам или биомаунт. Срезы просматривали на «Leica DM RXA2».

Для количественного анализа целый семенник после взвешивания помещали в смесь воды, ледяной уксусной кислоты, глицерина и 5%-ной сахарозы (7,5:1:1:0,5) на 2-3 нед. Затем его механически разрушали и суспендировали; полученную суспензию клеток анализировали в камере Горяева с помощью фазово-контрастного устройства при общем увеличении 400× («Opton», Германия). В семенниках контрольных и подопытных животных проводился подсчет всех встречающихся клеток и отдельно следующих типов клеток: профазных сперматоцитов на стадиях поздней пахитены и зиготены, округлых сперматид, сперматозоидов, клеток Сертоли.

Для цитогенетического и цитоспектрофотометрического анализов, а также для анализа структуры хроматина КС готовили отпечатки сперматогенных клеток и давленные препараты. Один из извлеченных семенников разрезали пополам, промокали фильтровальной бумагой поверхность среза, а затем делали отпечатки на предметном стекле. Препараты высушивали на воздухе и фиксировали в 10% забуференном растворе формалина (рН 7.2) в течение 10-15 мин. После чего отмывали в проточной воде и высушивали на воздухе. Другую часть семенника помещали в 7% раствор PVP (поливинилпирролидона) на льду, максимально разделяли каналы, затем переносили их на предметное стекло в каплю PVP, покрывали полиэтиленовой пленкой, накрывали еще одним предметным стеклом и раздавливали, затем охлаждали в парах жидкого азота, удаляли полиэтиленовые пленки с поверхности, фиксировали в 96% спирте. Отпечатки и давленные препараты окрашивали по Фельгену: кислотный гидролиз в 5N HCl при 37°C в течение 11 мин с последующим окрашиванием в реактиве Шиффа в течение одного часа при комнатной температуре (Маршак и др., 1970).

Для визуализации и подсчета гетерохроматиновых глыбок готовили давленные препараты и окрашивали по Фельгену или флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (Sigma).

Для выявления морфологии ядрышек готовили отпечатки и давленные препараты семенника, фиксировали в течение 10 мин в 96%-ном спирте. После этого препараты обрабатывались 0.1%-ным раствором тритона X-100 (5 мин) и промывали в двух сменах 50%-ного этилового спирта (по 10 мин). После высушивания на препарат наносили смесь, состоящую из 2 объемных частей 50%-ного нитрата серебра и 1 части 2%-ной желатины (Howell, Blak, 1980). После этого предметное стекло покрывали полиэтиленовой пленкой, помещали во влажную камеру и переносили в термостат (60°C, 10 мин). Реакцию останавливали промывкой препарата в холодной проточной воде, затем стекло на 30 сек помещали в 5%-ный раствор гипосульфита натрия, после чего снова промывали в проточной воде. Препараты докрасивали метиловым зеленым.

Для иммуноцитохимического выявления КС использовали антитела mouse monoclonal IgM anti-vimentin (Sigma, разведение 1:100 в блокирующем растворе). Культуру клеток Сертоли выращивали на стеклышках (d=10-12 мм), (см. протокол культивирования КС). Клетки фиксировали в 4%-ном ПАФ (15 мин), затем отмывали в PBS. Для блокады эндогенной пероксидазы стеклышки с клетками инкубировали в 3%-ном растворе H₂O₂ (Sigma) 20 мин при комнатной температуре. Затем отмывали и помещали в 0,05% раствор тритона X-100 (Helicon) на 15 мин. После отмывки в PBS (Phosphate buffered saline, 10 mM, pH 7.4), для блокировки неспецифического связывания антител с тканевыми антигенами клетки 30 мин инкубировали в блокировочном растворе (3% goat serum (Invitrogen), 7% BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma)) во влажной камере. Затем на стеклышки с клетками наносили первые антитела (1,5 ч, комнатная температура, влажная камера). Отмыв первые антитела, еще час инкубировали со вторыми антителами goat anti-mouse IgM, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, разведение 1:250 в PBS-Tween 20). Затем отмывали, помещали в раствор стрептавидин-пероксидазы хрена (VectorLab) на 30 мин, вновь отмывали и для выявления пероксидазы хрена 6-10 мин держали в растворе хромогена 3,3'-диаминобензидина - DAB (VectorLab). После достижения желаемой интенсивности окраски стеклышки 3 мин промывали в холодной проточной воде, высушивали и заключали в канадский бальзам.

В случае двойной окраски на vimentin/BrdU за 15–19 ч до окрашивания в среду к клеткам добавляли BrdU, 25 мг/мл (Sigma). После промывки стеклышек в холодной воде (после окрашивания на vimentin) их промывали в PBS, повторно фиксировали в 4%-ном ПАФ, промывали, денатурировали ДНК в растворе: 4N HCl : 70%-ный спирт (1:1) 30 мин, промывали и затем инкубировали 1, 5 ч с биотинилированными антителами mouse monoclonal IgG anti-BrdU (Sigma, разведение 1:75 в PBS-Tween 20). После отмывки антител, помещали в раствор стрептавидин-пероксидазы хрена на 30 мин, вновь отмывали, 6-10 мин инкубировали в растворе DAB (VectorLab). После достижения желаемой

интенсивности окраски стеклышки 3 мин промывали в холодной проточной воде, высушивали и заключали в канадский бальзам.

Для иммунофлуоресцентного выявления КС использовали первые антитела rabbit polyclonal IgG anti-Wilms tumor 1 (Invitrogen, разведение 1:50 в блокирующем растворе), а в качестве вторых антител - флуоресцентные антитела donkey anti-rabbit (AlexaFluor 488, разведение 1:1000 в PBS-Tween 20). Клетки фиксировали в 4%-ном ПАФ (15 мин), затем отмывали в TBS (Tris buffered saline, 50 mM, pH 7.4) и помещали в 0,05% раствор тритона X-100 (Helicon) на 15 мин. После отмывки 30 мин инкубировали в блокировочном растворе (5% BSA). Затем на стеклышки с клетками наносили первые антитела (1,5 ч, комнатная температура). Отмыв первые антитела, еще час инкубировали со вторыми антителами в темноте. Затем отмывали и помещали в раствор 4,6-диамидино-2-фенилиндола - DAPI (VectorLab) на 30 мин (в темноте). Затем стеклышки отмывали в TBS и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа «Leica DM RXA2» при длине волны 360 нм.

II.5. Цитогенетические методы

II.5.1. Метод учета сперматогониальных и мейотических микроядер (микроядерный тест)

Микроядерные структуры – это окруженные ядерной мембраной хромосомные фрагменты или целые хромосомы, не включившиеся после клеточных делений – митотических или мейотических – в дочерние ядра. Они обычно располагаются дискретно в непосредственной близости от основного ядра, либо остаются тонко связанными с ним. В зависимости от своего происхождения микроядра могут иметь мелкие либо крупные размеры (рис. 3). Известно, что микроядерные структуры могут обладать сравнительно высоким уровнем устойчивости, способны сохранять на протяжении нескольких клеточных поколений свою целостность, могут проявлять транскрипционную активность (Fenech et al., 2011; Huang et al., 2011).

Микроядерный тест – надежный и воспроизводимый метод оценки хромосомных повреждений и повреждений аппарата деления клеток. Под воздействием мутагенных факторов физической или химической природы относительное число клеток с микроядерными aberrациями может возрастать в несколько раз (Müller, Streffer, 1994; Bolognesi et al., 2011).

В настоящей работе частоту встречаемости клеток с микроядрами определяли в популяции сперматогониев, округлых сперматид и спермиев у контрольных и подопытных мышей-гибридов СВА×С57/ВL6 в экспериментах по изучению последствий мутагена дипина и наночастиц золота. На окрашенных по Фельгену препаратах просматривали 300-500 сперматогониев, не менее 1000 округлых сперматид от каждого животного. Число генетически аномальных сперматогониев и округлых сперматид выражали в промилле.

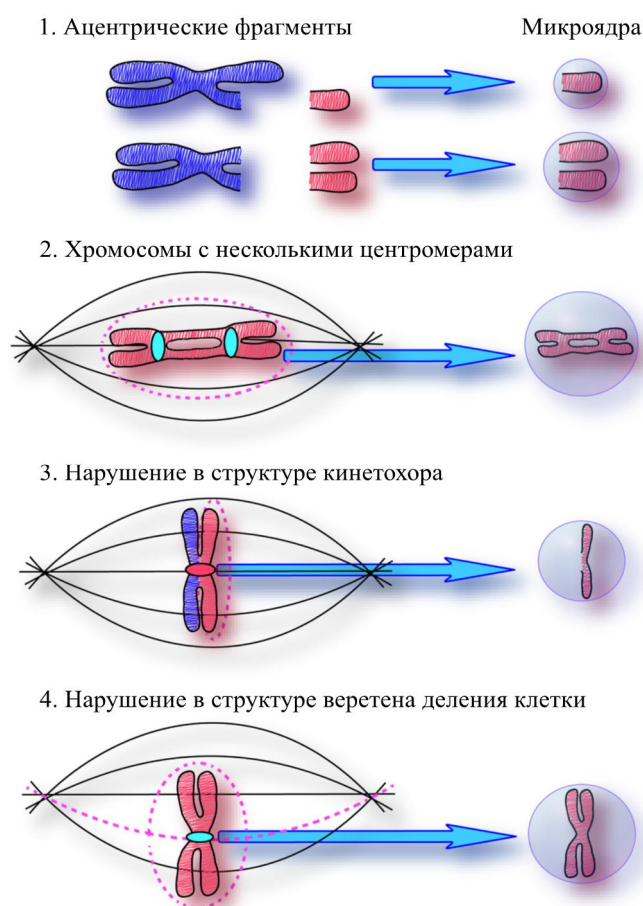


Рис. 3. Схематическое изображение механизмов формирования микроядер (по данным Muller et al., 1994).

II.5.2. Метод учета аномалий форм головок спермиев (АФГС)

Для исследования воздействия химического мутагена дипина и наночастиц золота на сперматогенез у мышей проводили тест на АФГС, разработанный в 1978 г. Уиробеком и Брюсом (Wyrobek, Bruce, 1978). Известно, что формообразование мужских гамет контролируется многими генами на диплоидном уровне, расположенными в разных участках генома. Увеличение частот АФГС рассматривается как результат индуцированных точечных генных изменений или микроделеций. Хотя в последнее время считается, что они могут образовываться и в результате анеуплоидии или крупных хромосомных перестроек, происходящих в сперматоцитах I порядка и сперматогониях. Все изученные мутагены дали положительные результаты в этой тест-системе (Wyrobek et al., 1984; Sinha, Rao, 1985; Meistrich, 1989; Kuriyama et al., 2005).

Для определения частоты встречаемости тестикулярных спермиев с морфологически аномальными головками (Wyrobek, Bruce, 1978), у подопытных и контрольных мышей просматривали не менее 300 клеток от каждого животного. Число аномальных сперматозоидов выражали в процентах.

II.6. Цитоспектрофотометрический анализ

Количественное определение содержания ДНК-фуксина в ядрах клеток Сертоли и спермиях проводили с помощью метода прямой сканирующей денситометрии. Для этого был использован микроденситометр Виккерс-М86 (Англия), работающий по принципу бегающего луча. Измерения проведены при длине волны 540 нм. Количество ДНК-фуксина измеряли дифференциальным методом, вычитая из интегральной плотности объекта интегральную плотность фона такой же площади (Агроскин и др., 1976). Количество ДНК-фуксина определялось в ядрах клеток Сертоли *in vitro*; просматривали не менее 80 ядер.

II.7. Метод деконденсации хроматина спермиев *in vitro*

Этот метод использован в опытах с введением наночастиц золота *in vivo* и *in vitro* у мышей, а также при интратестикулярном введении дипина.

При изучении воздействия наночастиц золота на сперматозоиды мышей в условиях *in vitro* животных забивали путем дислокации шейных позвонков, извлекали эпидидимисы, каудальные отделы которых помещали в физиологический раствор, тщательно измельчали, и готовили суспензию спермиев. После центрифугирования (1000g, 15 мин) надосадочную жидкость сливали, а осадки спермиев разбавляли в 1 мл 1%-ного раствора натрия додецилсульфата (НДС, Sigma, USA), детергента, разрушающего плазматическую мембрану; полученную суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем суспензию разделяли на несколько частей. В одну из них добавляли физиологический раствор (контроль), в остальные – комплекс, состоящий из наночастиц золота (размером ~2.5 нм) и среды, в концентрациях, соответственно, 1×10^{15} и 0.5×10^{15} частиц на 1 мл (ч/мл). Наночастицы Au синтезировали по методу Даффа (Duff et al., 1993). К 45.5 мл деионизованной воды добавили при перемешивании 1.5 мл 0.2 М раствора NaOH, 1 мл водного раствора хлорида тетрагидроксиметилфосфония концентрацией 9.6 мг/мл и спустя 5 мин 2 мл 1%-ного раствора HAuCl_4 . Реакционная смесь мгновенно приобрела темно-коричневую окраску, что свидетельствовало об образовании ультрамалых частиц золота. Средний размер наночастиц в полученном коллоидном растворе, определенный методом динамического рассеяния света на приборе Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания), составил ~3 нм; числовая концентрация частиц $\sim 1 \times 10^{15}$ мл⁻¹. Гидрозоле золота хранили в темноте при температуре 4°C и использовали через 2.5 мес после приготовления (Yevdokimov et al., 2011). За это время происходила перестройка достаточно дефектной в момент получения структуры наночастиц золота (“созревание” гидрозоля), которые приобретали выраженные металлические свойства (Морозов и др., 2012).

Через 20 или 40 мин в контрольные и опытные образцы добавляли по 0.3 мл 0.01М раствора дитиотреитола (ДТТ, Sigma, USA), приготовленного на трис-НСI буфере (рН=8.0), и продолжали инкубацию в течение 20 и 40 мин при комнатной температуре. Тиоловый реагент ДТТ разрушает перекрестные дисульфидные мостики в структуре плотно упакованного хроматина мужских гамет и уменьшает плотность сжатия ядерного материала (Zirkin et al., 1985).

По завершении инкубации спермиев в растворе ДТТ готовили мазки, которые после высушивания фиксировали в 96%-ном этиловом спирте в течение 10 мин и затем окрашивали 0.1%-ным раствором толуидинового синего (Fluka, Switzerland). Мазки окрашенных спермиев с различной степенью деконденсации ядер анализировали с помощью микроскопа "Opton" (West Germany) при общем увеличении 1000×, просматривая 100 случайно выбранных полей зрения.

При изучении влияния на состояние хроматина эпидидимальных спермиев внутрибрюшинного введения наночастиц золота и интратестикулярного введения дипина следовали описанной выше схеме деконденсации, но без инкубации с наночастицами золота *in vitro*: эпидидимисы измельчали, центрифугировали (1000g, 15 мин), надосадочную жидкость сливали, осадки спермиев разбавляли в 1 мл 1%-ного раствора НДС. Через 30 мин добавляли 0,3 мл ДТТ, приготовленного на трис-НСI буфере (рН 8.0) и продолжали инкубацию в течение 20, 40 при комнатной температуре. По завершении инкубации готовили мазки.

II.8. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью программы STATISTICA 8.0. При оценке достоверности различий средних в случае больших выборок (количественный анализ) использовали параметрический критерий Стьюдента, а для оценки достоверности различий между небольшими выборками (цитогенетический анализ, тест на АФГС) использовали непараметрический критерий Вилкоксона при стандартном уровне значимости $p \leq 0.05$.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

III.1. Изучение динамики развития мужских половых клеток у мышей после интратестикулярного введения модельного мутагена дипина

III.1.1. Количественный анализ сперматогенеза

В ходе эксперимента у контрольных мышей (физиологический раствор) число пахитенных сперматоцитов к 14 сут незначительно уменьшалось по сравнению с 7 сут, и восстанавливалось на 56 и 100 сут после начала эксперимента (рис 4). У подопытных животных, начиная с 7 сут, число пахитенных сперматоцитов снижалось и на 14 сут фиксации практически достигало нулевого значения. Восстановление пула пахитенных сперматоцитов постепенно начиналось с 35 сут; на 56 и 100 сут число этих клеток вновь достигало уровня контроля.

Число округлых сперматид и сперматозоидов у контрольных мышей в процессе проведения эксперимента изменялось сходным образом. На 7 сут эксперимента их было достоверно больше, чем в семенниках у интактных животных, к 35 сут происходило постепенное снижение их числа, а с 56 сут их число вновь возрастало и к 100 сут фиксации достигало уровня интактного контроля. Аналогичная тенденция количественных изменений спермиогенных клеток наблюдалась и у подопытных самцов: при этом число как округлых сперматид, так и сперматозоидов было достоверно ниже по сравнению с контролем на 14 и 35 сут, а на 56 и 100 сут после начала эксперимента число этих клеток было сравнимо с контрольным уровнем.

У контрольных мышей число КС на протяжении эксперимента достоверно не менялось. У подопытных мышей на 14 сут фиксации число КС достоверно возрастало, а на 35 сут, наоборот, снижалось. На 56 и 100 сут число КС вновь восстанавливалось до исходного уровня.

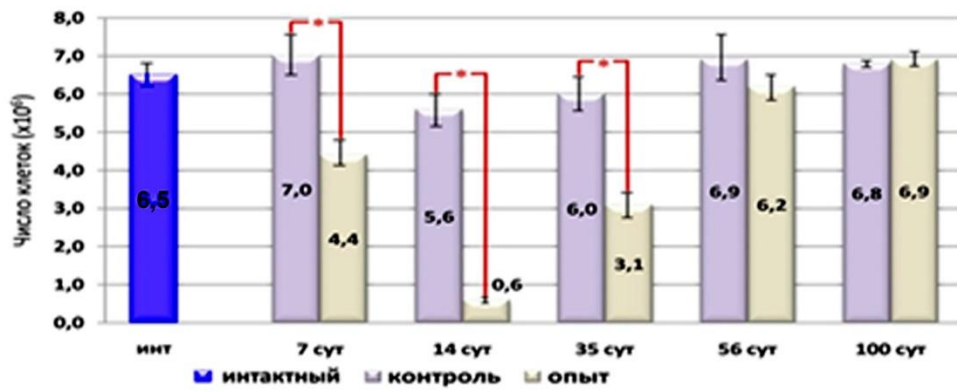
Таблица 1. Количественный состав клеток сперматогенного эпителия у мышей контрольной и подопытной групп ($\times 10^6$) в расчете на один семенник.

Сроки фиксации (сут)		Число жив.	Типы клеток, $\bar{X} \pm m_{\bar{x}}$			
			ПС	ОС	СП	КС
Интактный контроль		3	6,5 \pm 0,3	17,0 \pm 0,9	13,8 \pm 1,0	4,3 \pm 0,1
7	Контроль	3	7,0 \pm 0,5	21,3 \pm 1,1	18,6 \pm 1,2	4,4 \pm 0,3
	Опыт	4	4,4 \pm 0,3*	18,4 \pm 1,1	16,1 \pm 0,8	3,9 \pm 0,2
14	Контроль	5	5,6 \pm 0,4	14,0 \pm 0,9	12,6 \pm 0,5	4,4 \pm 0,2
	Опыт	6	0,6 \pm 0,1*	10,4 \pm 0,5*	15,9 \pm 0,6*	5,1 \pm 0,3*
35	Контроль	4	6,0 \pm 0,4	9,7 \pm 0,7	8,2 \pm 1,0	3,9 \pm 0,4
	Опыт	4	3,1 \pm 0,3*	1,0 \pm 0,2*	0,5 \pm 0,1*	3,1 \pm 0,4
56	Контроль	4	6,9 \pm 0,6	14,0 \pm 1,0	10,5 \pm 0,1	4,2 \pm 0,3
	Опыт	4	6,2 \pm 0,2	12,3 \pm 0,9	10,6 \pm 0,5	3,9 \pm 0,6
100	Контроль	4	6,8 \pm 0,1	18,8 \pm 1,1	14,3 \pm 0,6	4,3 \pm 0,3
	Опыт	4	6,9 \pm 0,2	17,9 \pm 0,7	14,3 \pm 0,4	3,9 \pm 0,2

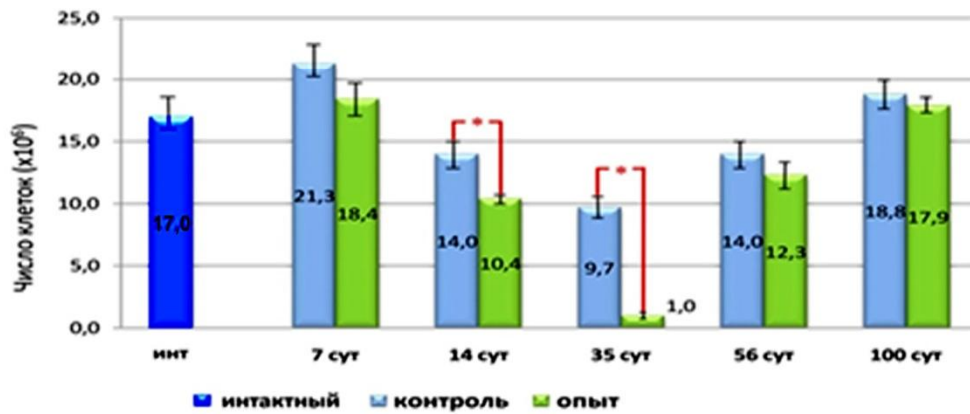
Обозначения: ПС – пахитенные сперматоциты, ОС – округлые сперматиды, СП – сперматозоиды, КС – клетки Сертоли.

Примечание: * - различия по сравнению с контролем статистически достоверны при $p \leq 0,05$.

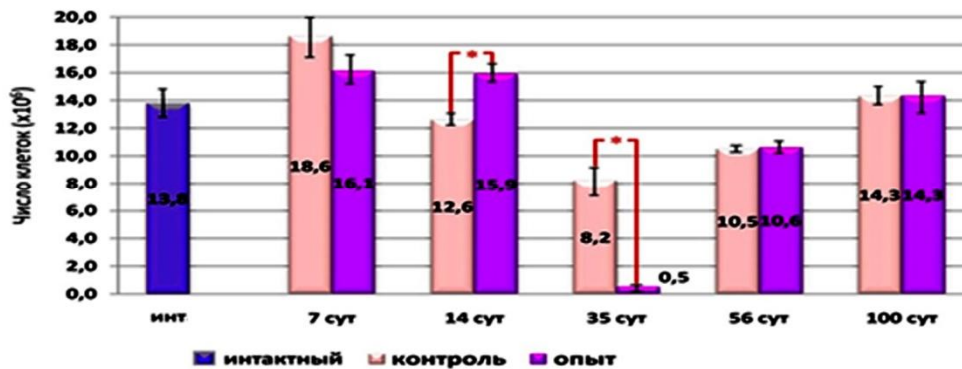
А) Пахитенные сперматоциты



Б) Округлые сперматиды



В) Сперматозоиды



Г) Клетки Сертоли

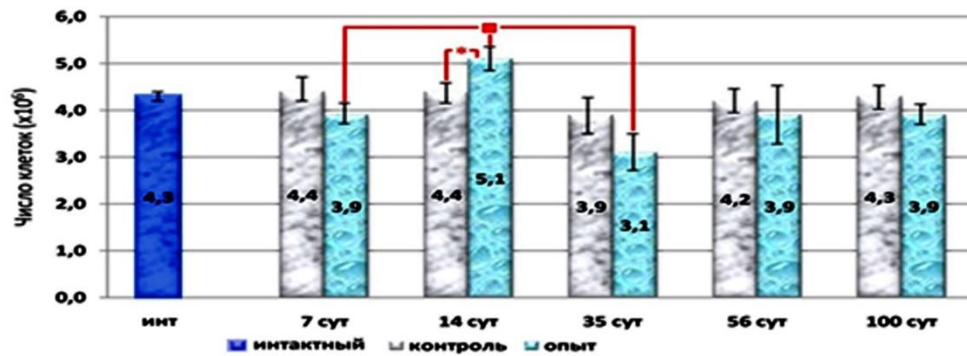


Рис.4 Результаты количественного анализа динамики изменения числа половых клеток и клеток Сертоли у контрольных и подопытных животных.

Примечание: * и ■ различия средних статистически достоверны при $p \leq 0,05$.

III.1.2. Гистологический анализ сперматогенного эпителия

У контрольных животных (физиологический раствор) на 7 сут фиксации было обнаружено большое разнообразие семенных канальцев по структуре сперматогенной ткани. В большинстве случаев на срезах встречались канальцы с нормальной структурой сперматогенного эпителия (рис.5 б). Он не отличался от такового у интактных животных (рис.5 а), в канальцах которых присутствуют половые клетки различных генераций, располагающиеся правильными концентрическими слоями вокруг просветов канальцев. В других областях семенников в канальцах обнаруживались самые разнообразные нарушения: дезорганизация сперматогенного эпителия и появление сравнительно большого числа гибнущих сперматоцитов I порядка (рис. 5 в, е), гипертрофированных округлых сперматид (рис. 5 д), а также клеток с апоптозоподобной структурой ядер (рис. 5 в, г). В семенниках каждого животного на серийных срезах были найдены области прокола капилляром, где после механического повреждения встречались множественные канальцы с нарушенной организацией сперматогенной ткани (рис. 5 е).

В подопытной группе у одного из четырех изученных животных наблюдалась полная дегенерация сперматогенной ткани (рис. 6 а); в канальцах встречались лишь КС; вся интерстициальная ткань и многие канальцы были забиты клетками иммунной системы. У других изученных животных семенники состояли из канальцев с гетерогенной структурой (рис. 6 б). Встречались канальцы с блоком развития половых клеток на стадии пахитенных сперматоцитов (рис. 6 в, д). Наблюдались нарушения на клеточном уровне, например, ядерные вакуоли в пахитенных сперматоцитах (рис. 6 в), слущивание клеток в просвет канальца (рис. 6 в, г). В некоторых канальцах фактически полностью отсутствовали сперматоциты I порядка, но спермиогенные клетки – округлые и удлиняющиеся сперматиды – продолжали обнаруживаться в большом числе (рис. 6 д). В области прокола капилляром присутствовали опустошенные от

половых клеток семенные каналцы и лейкоциты в интерстициальной ткани (рис. 6 е).

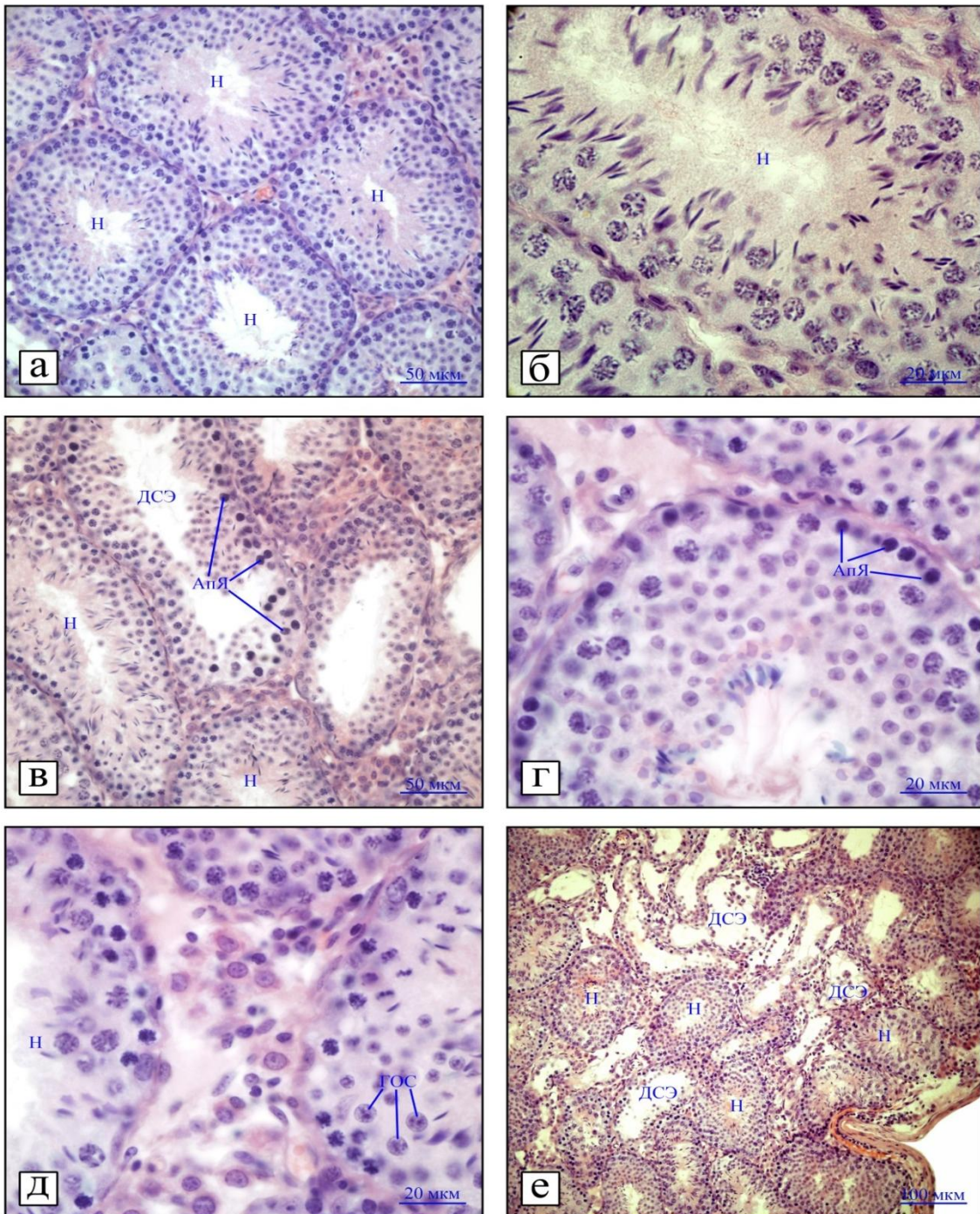


Рис. 5. Срезы семенников контрольных (7 сут после введения физиологического раствора) б - е и intactных мышей - а.

Обозначения: АпЯ – апоптотические ядра, ГОС – округлые сперматиды с крупными ядрами, ДСЭ – дезорганизация сперматогенного эпителия, Н – каналец с нормальным сперматогенезом. Окраска: гематоксилин-эозин.

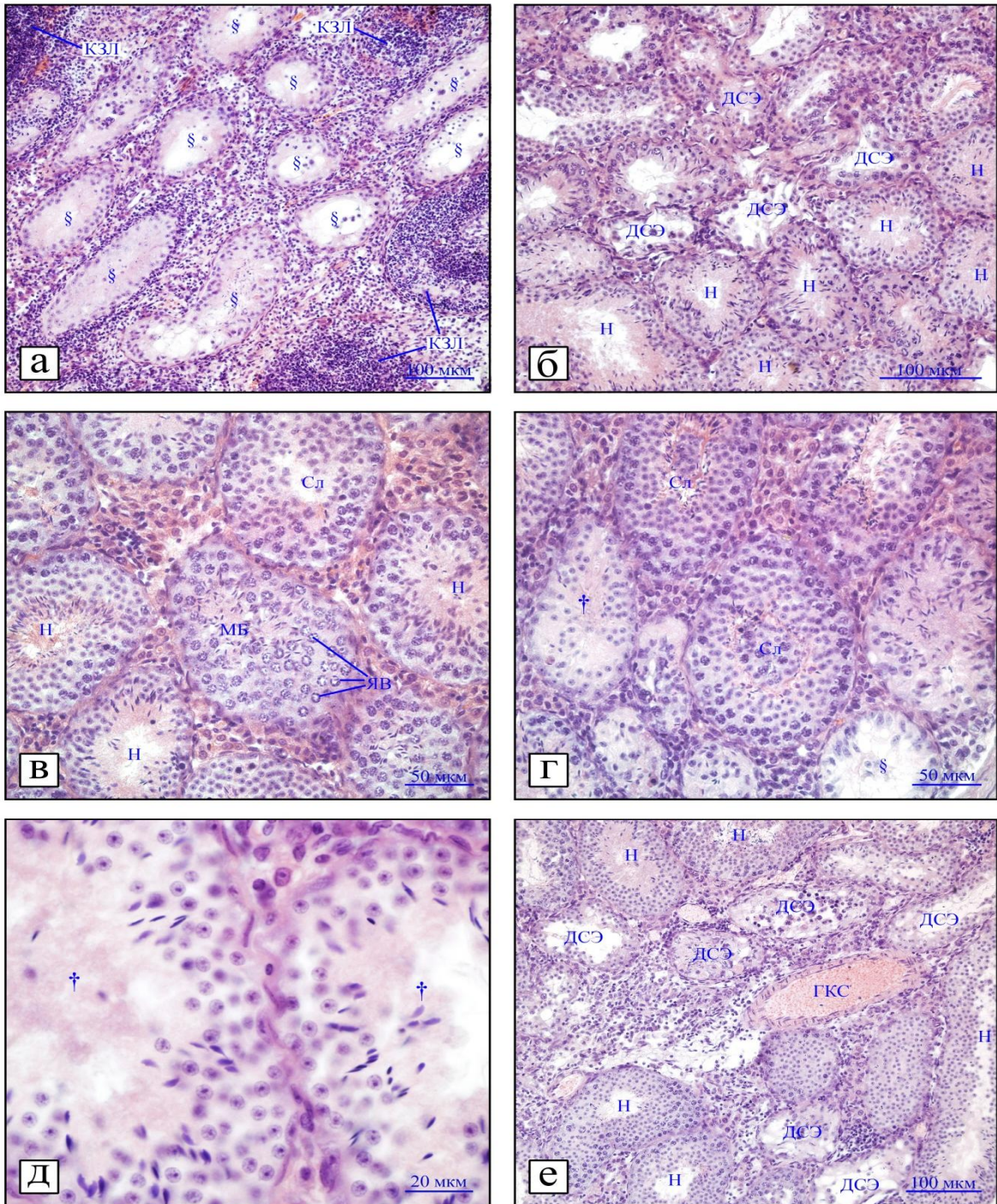


Рис. 6. Срезы семенников подопытных мышей на 7 сут после действия дипина.

Обозначения: ГКС – гипертрофированный кровеносный сосуд, ДСЭ – дезорганизация сперматогенного эпителия, КЗЛ – остовы канальцев, заполненные лейкоцитами, МБ – мейотический блок, Н – каналец с нормальным сперматогенезом, Сл – слущивания, ЯВ – ядерная вакуоль, § – канальцы, содержащие только КС, † – канальцы без мейотических клеток.

Окраска: гематоксилин-эозин.

На 14 сут фиксации у двух из пяти контрольных животных наблюдалась полная дегенерация сперматогенного эпителия (рис. 7 а). У остальных большинство канальцев сохраняли правильную округлую форму, в них не было замечено никаких значительных нарушений в развитии половых клеток (рис. 7 б). Иногда встречались канальцы с клетками, которые слущивались в просвет канальцев (рис. 7 в). При этом существенных клеточных аномалий не было выявлено. У одного из изученных самцов почти во всех канальцах наблюдался редуцированный сперматогенез (рис. 7 г).

В подопытной группе у двух из шести животных семенники также как и в контроле полностью дегенерировали: канальцы расходились и в них присутствовали только КС; структура интерстициальной ткани разрушалась (рис. 8 а). В других семенниках нарушения сперматогенной системы были значительными (рис. 8 б, в, г); в большинстве канальцев практически полностью отсутствовали мейотические клетки (рис. 8 в, г). Среди нарушений наиболее частыми были дезорганизация сперматогенного эпителия, слущивание половых клеток (рис. 8 б, в).

У контрольных самцов на 35 сут фиксации общая картина сперматогенеза в целом оставалась нормальной (рис. 9 а, б). Однако по сравнению с предыдущими сроками фиксации увеличивалось число таких нарушений как межклеточные пространства, ядерные вакуоли в сперматоцитах I порядка (рис. 9 б). Форма канальцев и структура интерстициальной ткани были нормальными.

У животных, подвергшихся действию дипина, на 35 сут фиксации нормальное течение сперматогенного процесса было нарушено во всех без исключения канальцах (рис. 9 в-е). Первое, что бросается в глаза – отсутствие в большинстве канальцев тех или иных типов сперматогенных клеток: можно выделить канальцы, в которых отсутствовали сперматиды или спермии (рис. 9 д). В канальцах часто встречались межклеточные пространства, клетки с ядерными вакуолями, отслоения (рис. 9 г, д); нередко присутствовали канальцы с дезорганизованной структурой сперматогенного эпителия (рис. 9 е).

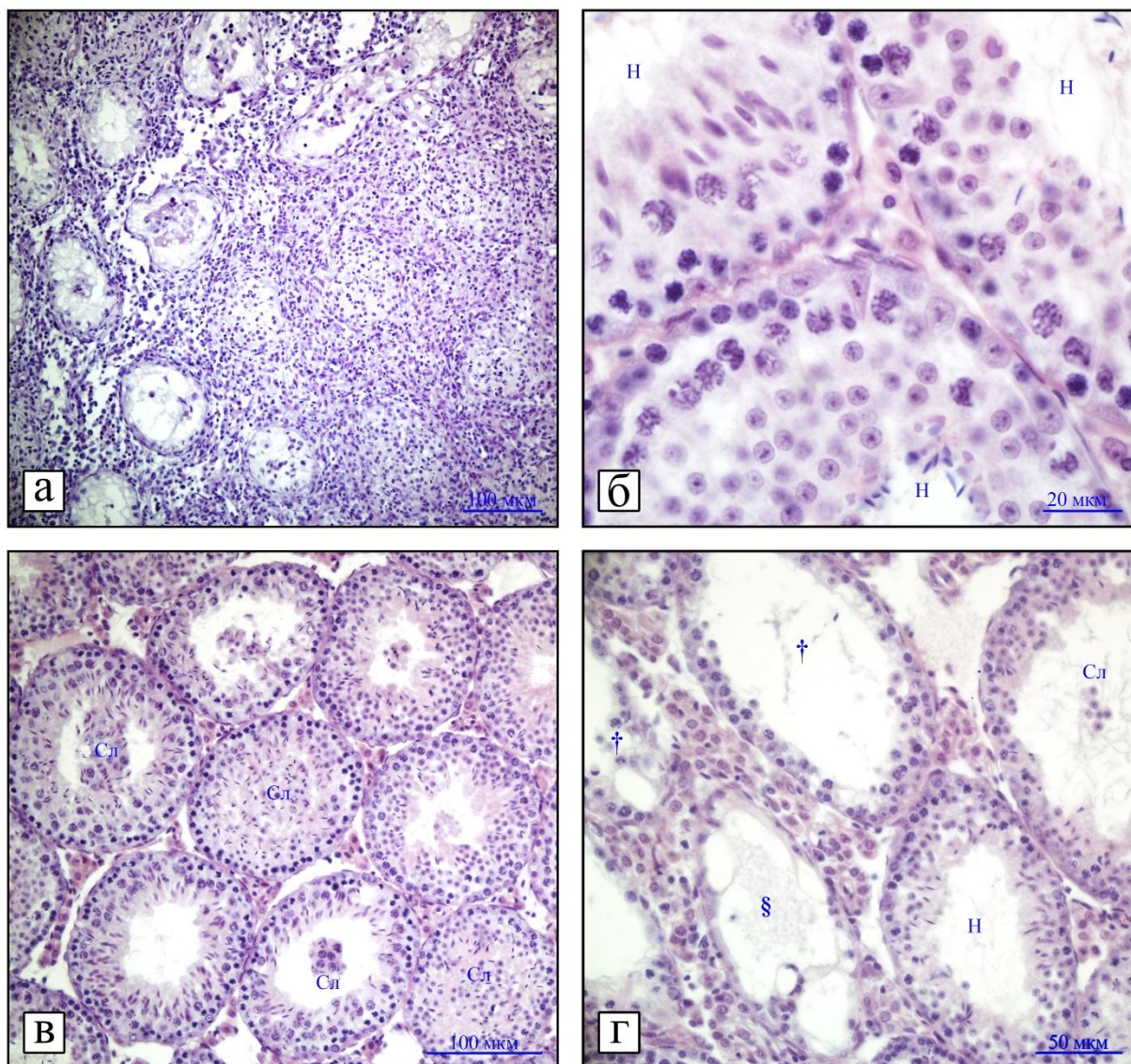


Рис. 7. Срезы семенников контрольных мышей на 14 сут после введения физиологического раствора.

Обозначения: Н – каналец с нормальным сперматогенезом, Сл – слущивание половых клеток в просвет семенного канальца, † – каналец без постмейотических половых клеток, § – каналец, содержащий КС и единичные половые клеток.

Окраска: гематоксилин-эозин.

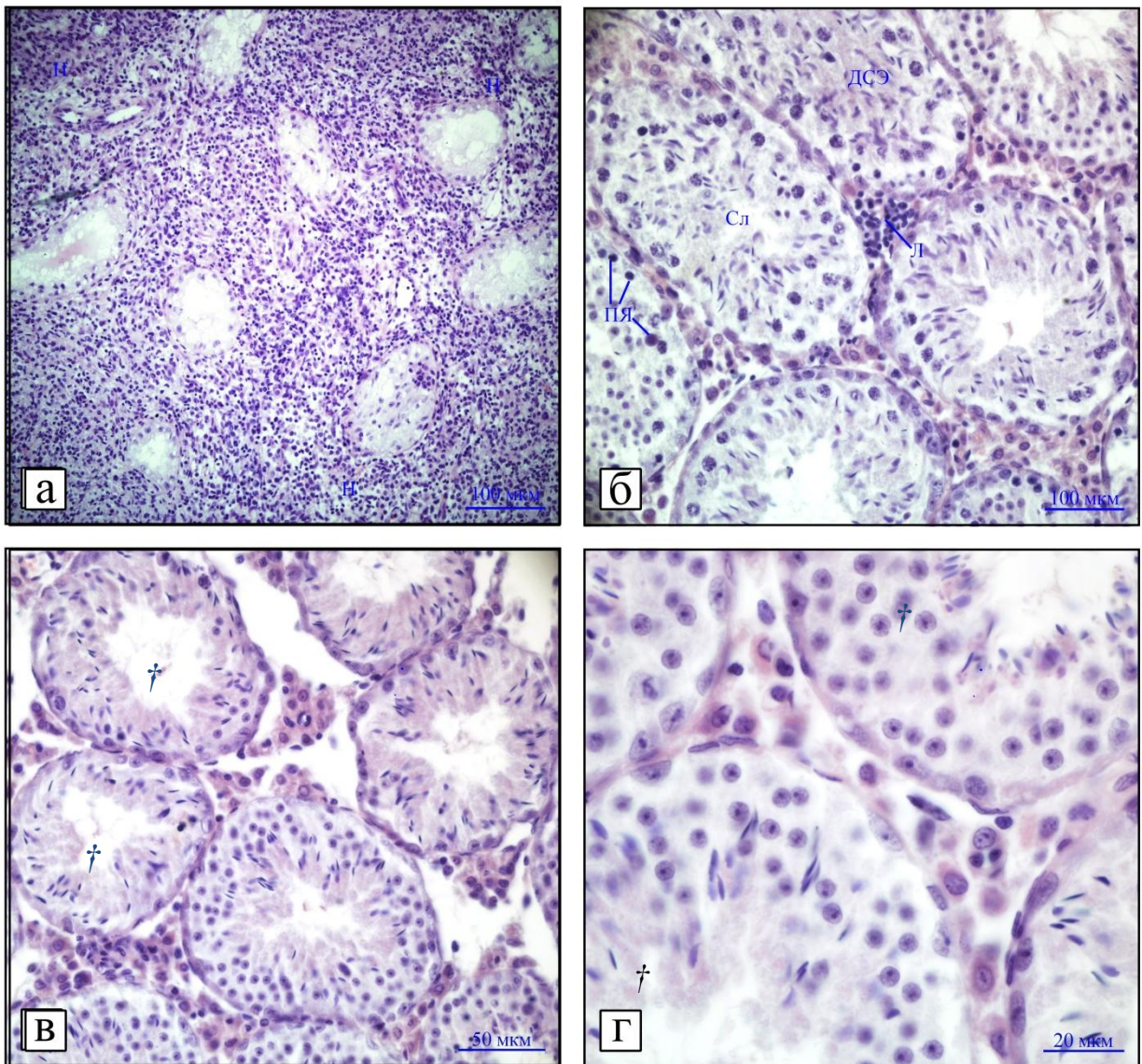


Рис. 8. Срезы семенников подопытных мышей на 14 сут после действия дипина.

Обозначения: ДСЭ – дезорганизация сперматогенного эпителия,
 Л – лейкоциты в интерстициальной ткани, ПЯ – пикнотические ядра,
 Сл – слущивание половых клеток в просвет семенного канальца,
 † – каналец с редуцированным сперматогенезом.

Окраска: гематоксилин-эозин.

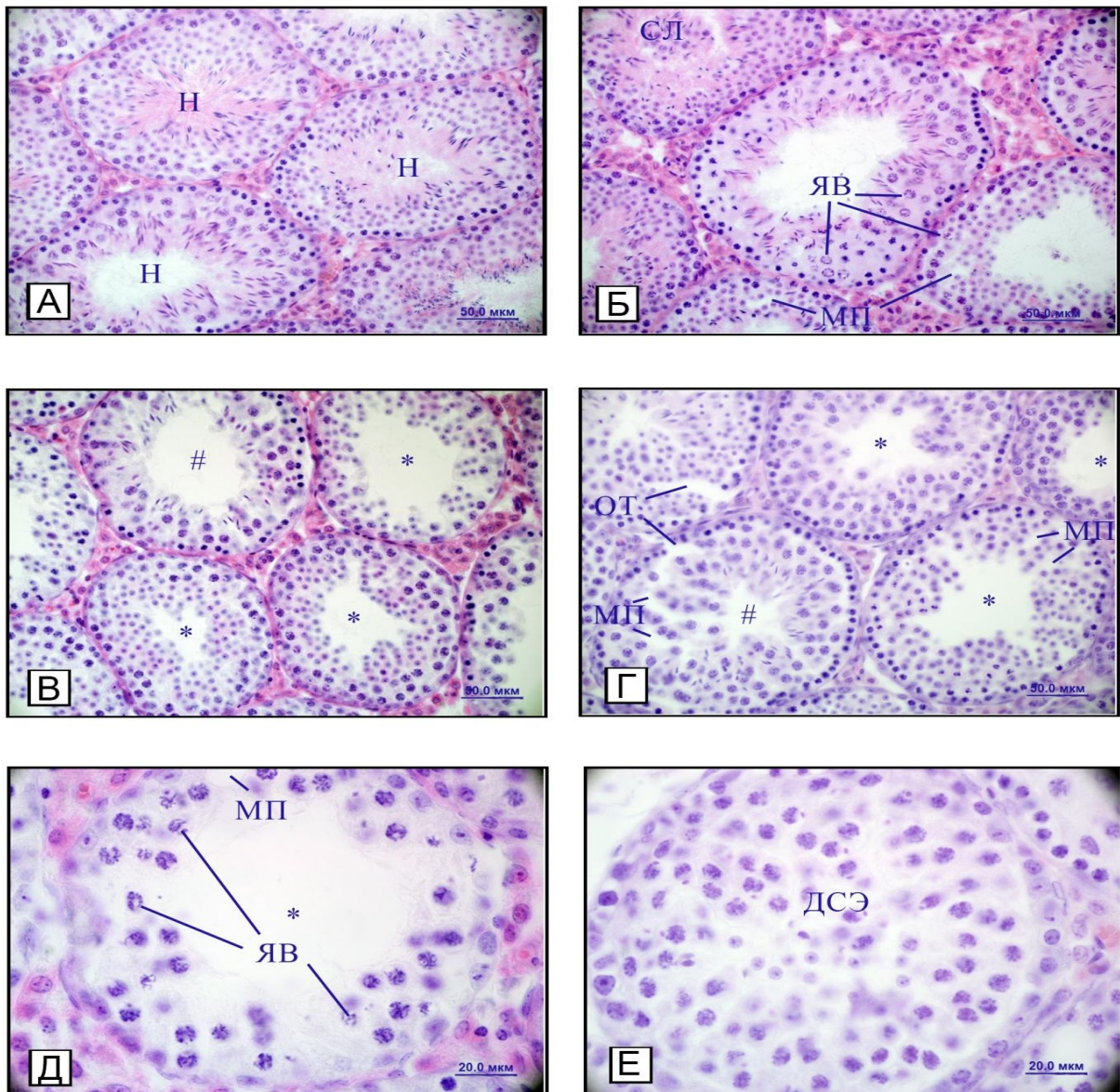


Рис.9. Срезы семенников контрольных (А,Б) и подопытных мышей (В - Е) на 35 сут эксперимента.

*Обозначения: ДСЭ - дезорганизация сперматогенного эпителия, МП - межклеточные пространства, Н – каналец с нормальным сперматогенезом, ОТ - отслоение сперматогенного эпителия от базальной мембраны, СЛ - слущивание сперматогенного эпителия в просвет каналца, ЯВ - ядерные вакуоли в половых клетках, * - каналцы, не содержащие сперматозоидов, # - каналцы без округлых сперматид с единичными сперматозоидами.*

Окраска: гематоксилин-эозин.

На 56 сут фиксации в контроле морфология сперматогенеза, как видно из рис. 10 (а, в), в большей части канальцев была нормальной. Канальца имели правильную форму, содержали все типы сперматогенных клеток и были окружены интерстициальной тканью нормального строения. При этом в некоторых канальцах иногда наблюдались слущивания половых клеток, отслоения от базальной мембраны и межклеточные пространства (рис. 10 б). У подопытных животных на 56 сут структура сперматогенного эпителия восстанавливалась по сравнению с предыдущим сроком фиксации (рис. 10 г). Тем не менее, отслоения и слущивание сперматогенных клеток в просвет канальца (рис. 10 д, е), межклеточные пространства (рис. 10 г, е) и дезорганизация структуры сперматогенного эпителия (рис. 10 е) продолжали обнаруживаться. В канальцах с нормальной морфологией присутствовали сперматогенные клетки всех типов, они располагались, как и при нормальном течении сперматогенеза, правильными концентрическими рядами (рис. 10 г).

На 100 сут эксперимента у контрольных мышей на срезах семенников видны как канальцы с нормальной структурой сперматогенного эпителия, так и канальцы с небольшими нарушениями (рис. 11 а, б, в): слущивания, дезорганизация. У опытных животных того же срока фиксации морфология сперматогенеза была схожей с контрольной. На гистологических срезах встречались канальцы с нормальной структурой сперматогенного эпителия (рис. 11 г, д, е), в то же время иногда встречались канальцы с дезорганизованным сперматогенным эпителием (рис. 11 е).

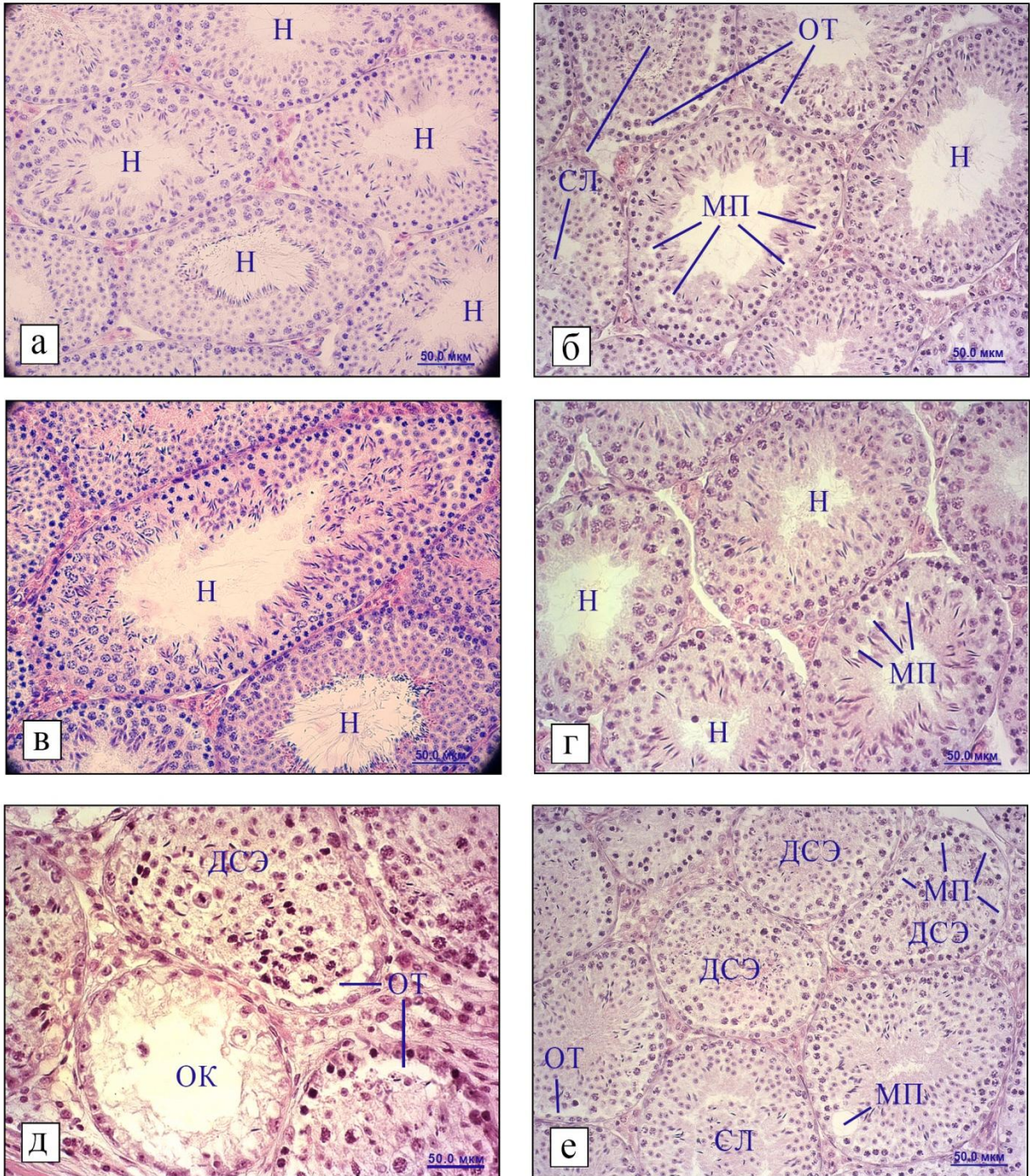


Рис.10. Срезы семенников контрольных (а-в) и подопытных мышей (г-е) на 56 сут эксперимента.

Обозначения: ДСЭ - дезорганизация сперматогенного эпителия, МП - межклеточные пространства, Н - каналец с нормальным сперматогенезом, ОК - опустошенный каналец, ОТ - отслоение сперматогенного эпителия от базальной мембраны, СЛ - слущивание сперматогенных клеток в просвет каналца. **Окраска:** гематоксилин-эозин.

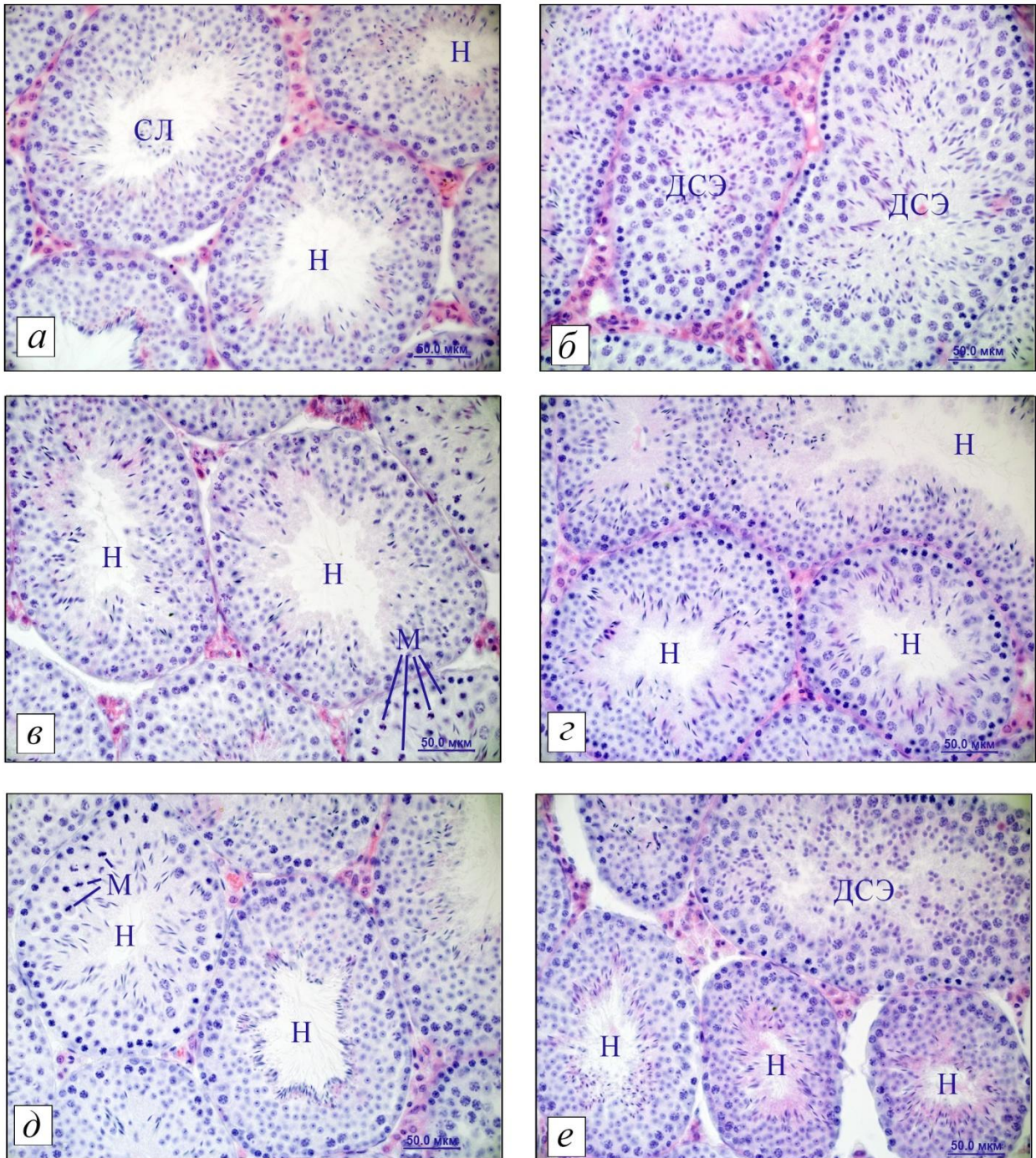


Рис.11. Срезы семенников контрольных (а-в) и подопытных мышей (г-е) на 100 сут эксперимента.

Обозначения: ДСЭ - дезорганизация сперматогенного эпителия, М - нормальные метафазы I деления мейоза, Н - каналец с нормальным сперматогенезом, СЛ - слущивание сперматогенного эпителия в просвет каналца.

Окраска: гематоксилин-эозин.

Ш.1.3. Цитогенетический анализ сперматогенеза

У контрольных и подопытных мышей на 35, 56 и 100 сут последействия частота встречаемости сперматогониев с микроядрами (рис. 12 а) (стволовые+дифференцирующиеся) была одинакова (рис. 13). То же справедливо и для популяции округлых сперматид (рис. 12 б, в; рис. 13). Интересно отметить, что как в контроле, так и в опыте на 100 сут фиксации число генетически аномальных сперматогониев и округлых сперматид существенно уменьшалось по сравнению с предыдущими сроками фиксации (35 и 56 сут) и возвращалось к уровню спонтанного мутагенеза (2-4 ‰).

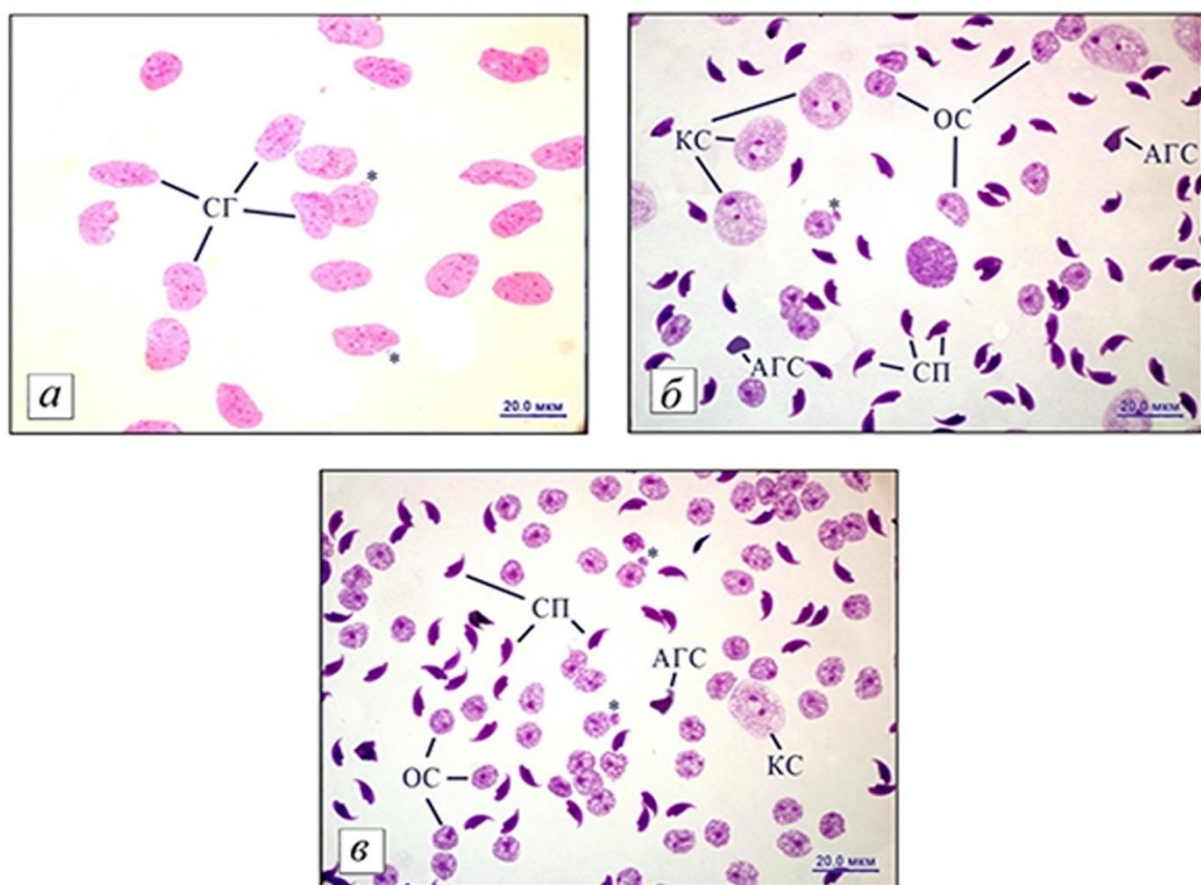


Рис. 12. Морфология ядер мужских половых клеток и КС на давленных препаратах семенных канальцев на 35 сут после действия дипина.

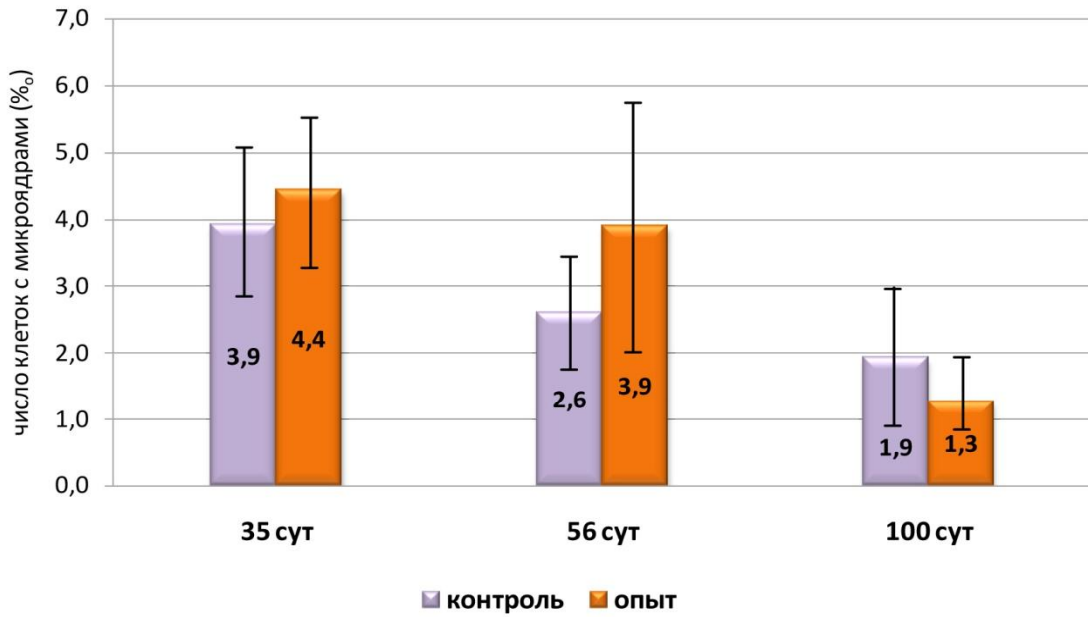
Обозначения: АГС – аномальные головки спермиев,

КС - ядро клетки Сертоли, ОС - округлые сперматиды, СГ – сперматогонии,

СП - сперматозоиды, * - микроядра.

Окраска: по Фельгену.

А) Сперматогонии



Б) Округлые сперматиды

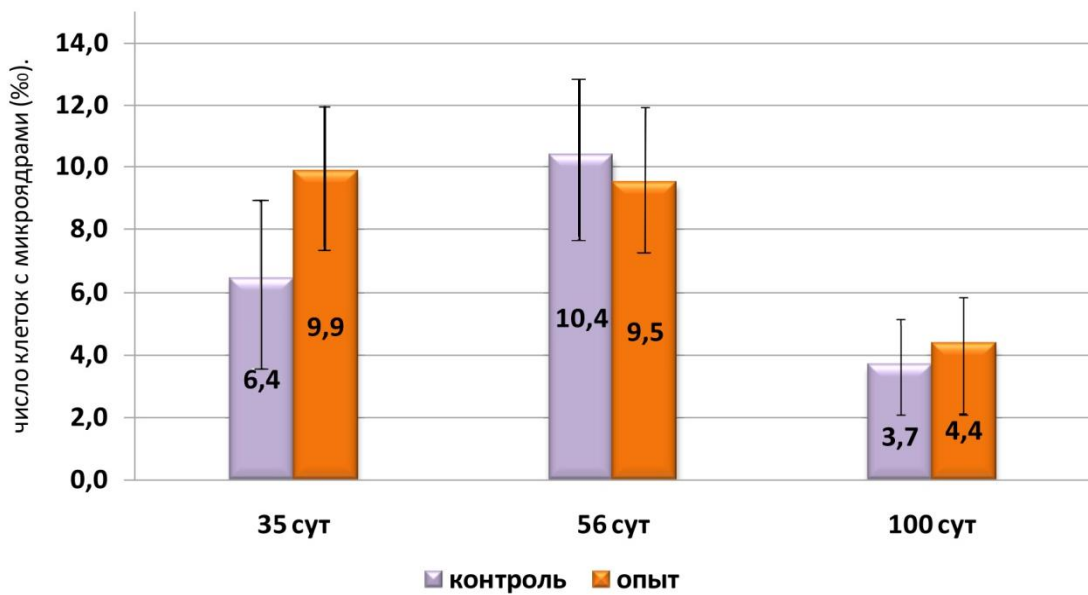


Рис.13. Динамика изменения частоты встречаемости сперматогенных клеток с микроядрами у контрольных и подопытных мышей (%).

Тест на аномалии форм головок спермиев показал (табл.2), что на 35 сут фиксации в гонадах подопытных мышей частота встречаемости aberrантных форм резко возросла по сравнению с контролем (различия статистически достоверны при $p < 0,05$). При этом сроке фиксации у одного подопытного самца

семенниках были обнаружены спермии только с аномальными формами головок (100%). На 100 сут последствий число морфологически аномальных сперматозоидов вновь снижалось до контрольного уровня.

Таблица 2. Частота встречаемости текстикулярных спермиев с аномальными формами головок у мышей контрольной и подопытной групп на отдаленных сроках фиксации (в %).

Сроки фиксации (сут)		Число жив.	АФГС, $\bar{X} \pm m_{\bar{x}}$
35	Контроль	4	1,72±1,07
	Опыт	4	58,50±16,23*
56	Контроль	4	2,14±1,03
	Опыт	4	0,93±0,41
100	Контроль	4	1,86±0,74
	Опыт	4	2,34±0,53

*Примечание: * - различия по сравнению с контролем статистически достоверны при $p \leq 0,05$; вертикальные линии показывают стандартную ошибку среднего.*

*Ш.1.4. Анализ способности к деконденсации *in vitro* ядерного хроматина эпидидимальных сперматозоидов*

Светооптические наблюдения выявили различную чувствительность эпидидимальных демембранизированных SDS спермиев мышей к эффекту ДТТ. По степени распаковки ядерного хроматина гаметы были разделены на три основные группы: недеконденсированные («интактные», в целом не отличающиеся от нативных ядер) (рис. 14 а, б, г), частично (рис. 14 в) и полностью деконденсированные (рис.14 а, б). Встречались также ядра с аномально распакованным хроматином (рис. 14 в, г).

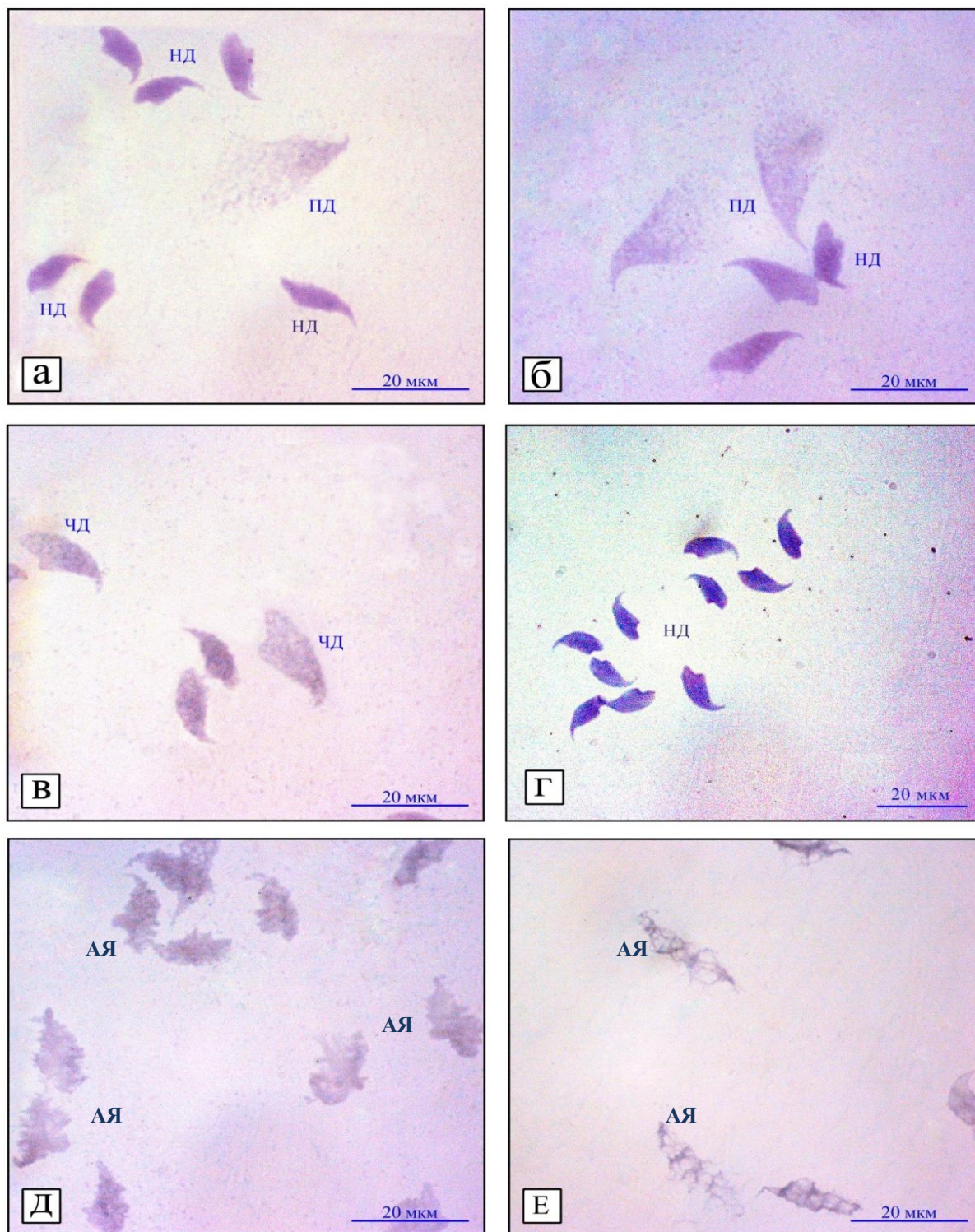


Рис.14. Ядра эпидидимальных сперматозоидов мышей после комбинированной обработки НДС/ДТТ.

Обозначения: АЯ – аномальные ядра,

НД – недеконденсированные, «интактные» ядра, ЧД – частично деконденсированные ядра, ПД – полностью деконденсированные ядра.

Окраска: толуидиновый синий.

Как видно из рис. 15, на 7 и 14 сут после начала эксперимента у контрольных (физиологический раствор) и подопытных (дипин) мышей процентное соотношение внутри каждой группы ядер - интактных, частично и полностью деконденсированных - было примерно одинаковым. Между тем хорошо видно, что на 14 сут как в контроле, так и в опыте значительно увеличивается число интактных ядер и уменьшается число клеток с полностью деконденсированным хроматином.

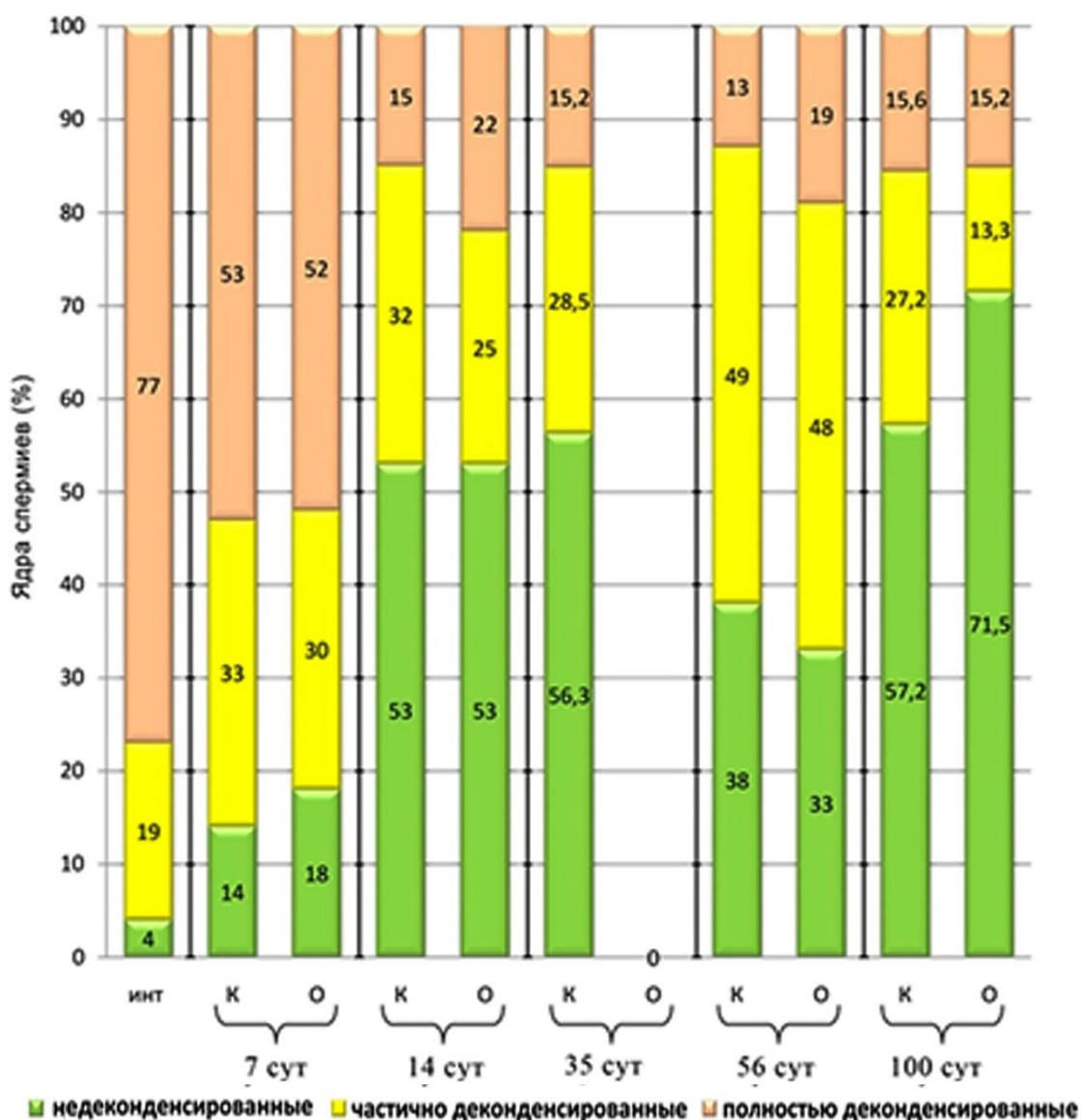


Рис.15. Соотношение числа сперматозоидов с разной степенью деконденсации хроматина в контроле и опыте после 40 мин инкубации в ДТТ.

На 35 сут в изученных образцах спермиев контрольных животных мы наблюдали ту же количественную картину, что на 14 сут, тогда как в опытном материале встречались лишь единичные интактные спермии (в расчет не брались) и несколько аномально деконденсированных клеток, которые при подсчете также не учитывались.

На 56 сут после начала эксперимента вновь между контролем и опытом различий по процентному соотношению различных типов ядер не было обнаружено. И хотя общие тенденции к деконденсации были схожи и сравнимы с теми, которые наблюдались на 14 сут, в обоих случаях все-таки преобладала доля гамет с частично деконденсированными ядрами.

На 100 сут как в контрольных, так и в опытных образцах существенно увеличивалось число спермиев с интактными ядрами, причем в опыте оно было максимальным. В то же время число спермиев с частично деконденсированными ядрами уменьшалось, а число спермиев с полностью деконденсированным ядерным хроматином оставалось фактически таким же, как это было установлено на 14, 35 и 56 сут после начала эксперимента

Ш.1.5. Оценка организации интерфазного ядра клеток Сертоли

Как в контроле, так и в опыте было выявлено разнообразие КС (рис. 16) по структуре и расположению околядрышкового гетерохроматина. Подсчеты показали (рис. 17), что число КС с 1 гетерохроматиновой глыбкой увеличивалось к концу эксперимента в 2-3 раза, число КС с 2 глыбками незначительно уменьшалось, а число КС с 3 глыбками уменьшалось в 4 раза. Кроме того, следует отметить, что на 35 сут после действия дипина у подопытных мышей в семенниках появлялись КС с 4 и 5 гетерохроматиновыми глыбками.

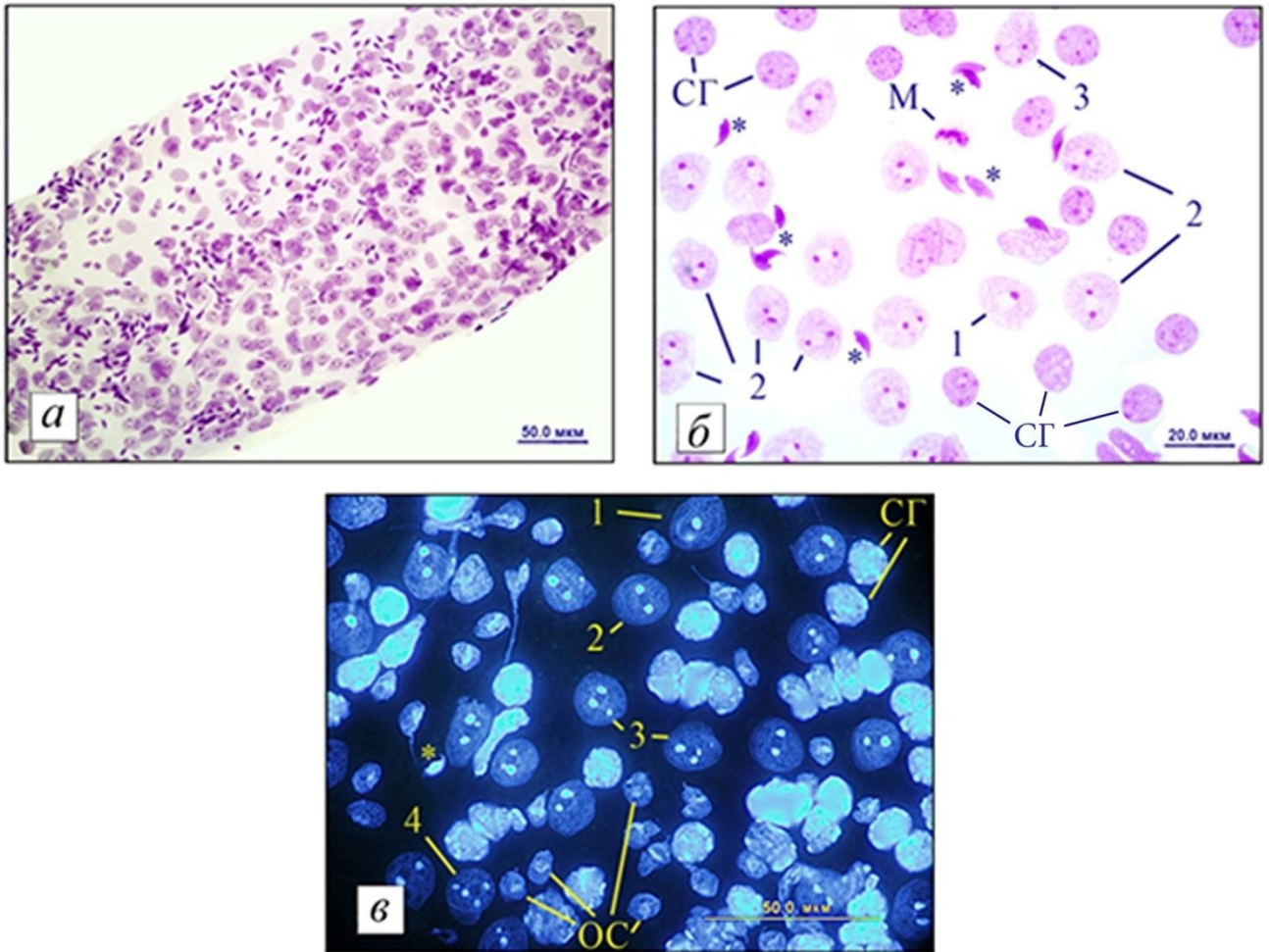


Рис.16. Морфология ядер мужских половых клеток и КС на давленных препаратах семенных канальцев.

Обозначения: 1 - ядро КС с одной гетерохроматиновой глыбкой, 2 - ядро КС с двумя гетерохроматиновыми глыбками, 3 - ядро КС с тремя гетерохроматиновыми глыбками, 4 - ядро КС с четырьмя гетерохроматиновыми глыбками, М – клетка на стадии метафазы, ОС - округлые сперматиды, СГ - сперматогонии, * - сперматозоиды.

Окраска: а, б – по Фельгену, в - Ноеchst 33342

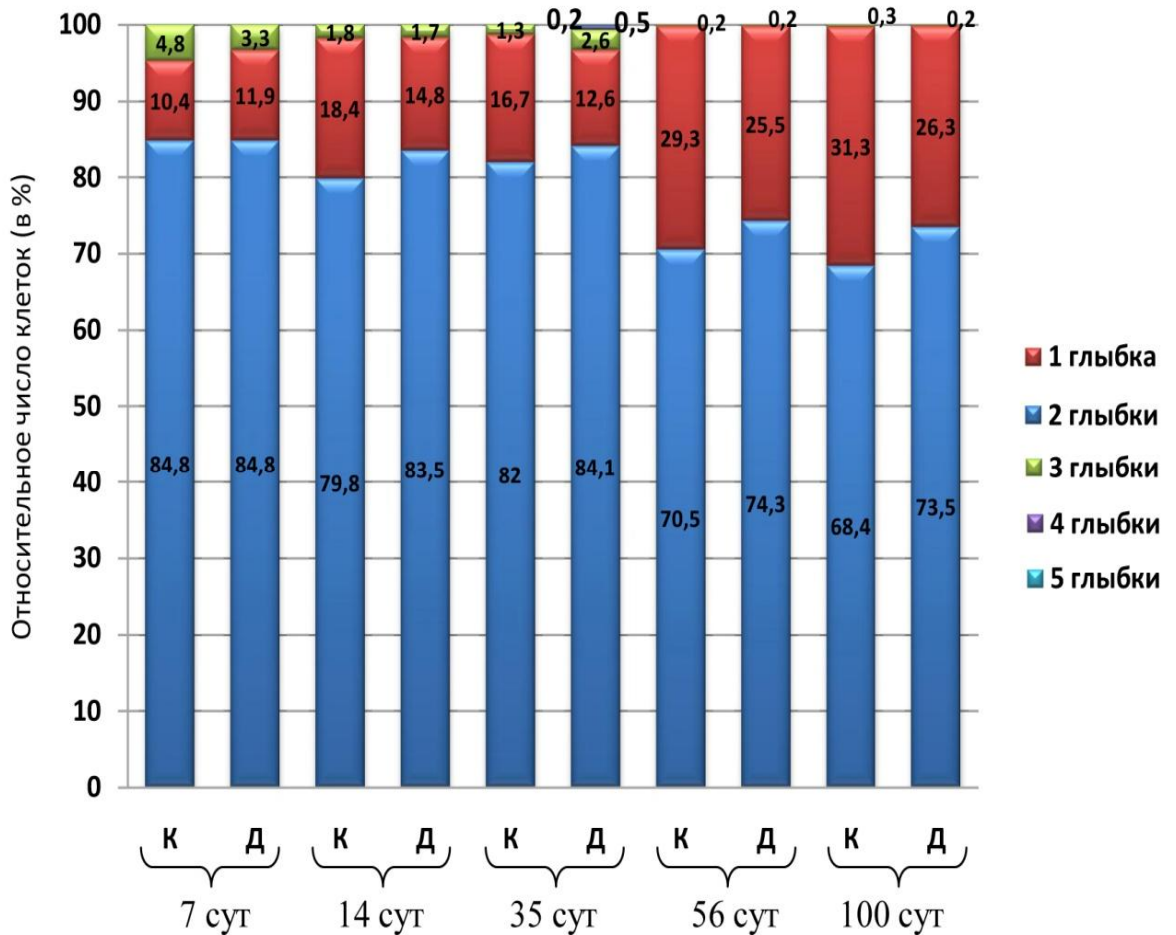


Рис.17. Соотношение количества КС с разным числом гетерохроматиновых флыбок у контрольных и подвергшихся воздействию дипина мышей.

Онтогенетическое изучение динамики сперматогенеза у мышей после интратестикулярного введения им модельного мутагена дипина имитирует условия *in vitro*, при которых, как известно, дистанция мутаген–клетка сводится к минимуму, и химический агент осуществляет прямое, практически не модифицированное вмешательство в организацию клеточной системы. Считается также, что в ограниченном пространстве разворачивающийся эффект более строг и точен. Что касается опытов *in vivo*, то в организме животного мутагенные молекулы абсорбируются и хаотично распределяются по разным органам, активно вовлекаются в сложные цепи синтетических метаболических процессов, обуславливая тем образование огромного числа промежуточных продуктов,

обладающих цито- и генотоксической активностью. Суммарный эффект последних способен усилить давление на сперматогенез.

Полученные в работе данные с большой очевидностью показали, что однократные интратестикулярные инъекции мышам химического мутагена дипина или физиологического раствора приводили к существенным деструктивным изменениям в пространственной организации сперматогенного эпителия. Однако в обоих случаях нарушения носили обратимый характер. При этом восстановительный процесс в мутагенизированных семенниках шел медленнее, чем в гонадах контрольных мышей.

Ранее уже было показано, что внутрибрюшинное введение цитотоксического и мутагенного агента дипина мышам-гибридам СВАхС57В1/6 вызывает у них резкое снижение числа половых клеток на 14, 28 и 35 сут фиксации, а также приводит к сильным морфологическим нарушениям в сперматогенном эпителии (Захидов, 1993; Махран, 1994). Нарушения, вызываемые дипином, приводят к активации процессов регенерации и к полному восстановлению сперматогенеза у подопытных мышей до уровня контроля.

В настоящем исследовании мы вводили дипин в интерстиций, чтобы снять опосредованные влияния со стороны всего организма. При этом динамика морфогистологических и количественных изменений сперматогенеза была сходной с той, что была представлена в работах с внутрибрюшинным введением (Захидов, 1993, Махран, 1994).

Если исходить из данных по кинетике сперматогенеза у мышей, то можно уверенно говорить о том, что значительное снижение в опыте числа пахитенных сперматоцитов на 14 сут, округлых сперматид и сперматозоидов на 35 сут вызвано повышенной чувствительностью дифференцирующихся и недифференцирующихся сперматогониев. Возможно, происходит торможение делящихся сперматогониальных клеток и /или их массовая гибель. Выжившие недифференцированные сперматогонии (стволовые и прогениторные) играют важную роль в восстановлении сперматогенеза. Об этом свидетельствуют результаты количественного анализа пахитенных сперматоцитов, округлых

сперматид и сперматозоидов на отдаленных сроках фиксации. Другими словами, как видно из рисунка 4 на 56 и 100 сут фиксации после действия дипина число этих клеток постепенно восстановилось. Важно добавить, что тот факт, что на 14 сут наблюдалось также значительное снижение числа округлых сперматид, дает право утверждать, что высокую чувствительность к действию дипина могли проявить также сперматоциты I (прелептотена-лептотена), находящиеся на стадии активного синтеза ДНК.

Что касается популяции КС, данные количественного анализа показывают незначительное, но статистически достоверное увеличение пула этих клеток на 14 сут после действия химического мутагена дипина. Хотя на 35 сут отмечается резкое, но временное уменьшение числа этих клеток. Известно, что под влиянием различных факторов поведение популяции высокодифференцированных, митотически инертных КС в семенниках половозрелых животных резко изменяется. Они переходят из состояния покоя к активной пролиферации (Захидов, 1993; Chaudhary et al., 2005; Zhang et al., 2006; Ahmed et al., 2009). Наряду с делениями КС работает механизм клеточного отбора, который отсеивает КС, имеющие генетические повреждения.

Интересно отметить, что в гонадах у контрольных мышей, которым инъецировали физиологический раствор, на 14 и 35 сут эксперимента происходило постепенное снижение числа практически всех типов сперматогенных клеток. Однако к 100 сут последствия количественные показатели сперматогенеза у контрольных мышей (физиологический раствор) достигали уровня интактного контроля. И в данном случае количественные изменения хорошо коррелируют с морфогистологическими наблюдениями. Так, например, на 14 и 35 сут, как в контроле, так и в опыте встречаются каналцы с редуцированным сперматогенезом, однако в мутагенизированных семенниках нарушения более выражены.

Подобное сходство в реакции сперматогенной системы у контрольных и подопытных животных позволяет заключить, что возникновение морфогистологических нарушений сперматогенеза может быть связано с

механическим повреждением (травмой) семенников при микроманипуляциях. Действительно, согласно некоторым наблюдениям (Weinbauer et al., 1985; Sprando et al., 1996), именно процедура интратестикулярных инъекций млекопитающим, а не вводимые химические вещества (в том числе физиологический раствор), вызывают повреждения структуры семенных канальцев и сперматогенного эпителия. Весьма интересные наблюдения были сделаны в свое время Андреевой и Серовой (1992). По их данным, такие микроманипуляции с зиготами мышей, как прокол стеклянной микроиглой мужского пронуклеуса, введение буферного раствора или генной конструкции, в дальнейшем после трансплантации зигот в яйцеводы самок-реципиентов приводили к нарушениям развития эмбрионов, их гибели или появлению потомства с пониженной жизнеспособностью. Причем, как подчеркивают авторы, наиболее травматичным этапом в эксперименте является прокол пронуклеуса зиготы. В определенной степени эти наблюдения были подтверждены другими исследованиями, показавшими, что микроинъекции буферного раствора или так называемый пирсинг пронуклеуса обладали сильным повреждающим действием, отрицательно влияющим на преимплантационные стадии развития грызунов (Попова и др., 2002; Porova et al., 2004).

Специфичность действия дипина, как высоко активного мутагена, непосредственно на семенники мышей нашла свое выражение в отсутствии сколько-нибудь резкого подъема по сравнению с контролем частот сперматогониальных и мейотических микроядерных aberrаций на отдаленных сроках после начала эксперимента (35, 56 и 100-е сут фиксации). Если исходить из данных по кинетике сперматогенеза у мышей (Meistrich, 1986), это означает, что внутритестикулярные инъекции дипина (впрочем, как и физиологического раствора) не индуцировали грубых изменений в структуре хромосомного аппарата сперматогониальных стволовых клеток (ССК). Пока трудно понять, почему в семенниках мышей кластогенный эффект дипина на ССК не проявляется в той же мере и также необратимо, как это было установлено нами ранее в опытах с его внутрибрюшинными введениями животным (Захидов и др., 1994 а; Кулибин, 2006). Вероятно, что при внутрибрюшинных инъекциях дипин

вступает в самые разнообразные обменные, биохимические процессы, формирует комплексы с многочисленными ферментами, активизируя или, наоборот, ингибируя их. В результате может образоваться множество промежуточных метаболитов, обладающих более сильным мутагенным началом. Последние в состоянии преодолевать мощные охранительные барьеры - базальную мембрану, гематотестикулярный барьер, а также специфические, чрезвычайно эффективные системы детоксикации и репарации, свойственные семенникам млекопитающих. Молекулы дипина в чистом виде такой способностью, видимо, не обладают. Другими словами, кластогенный потенциал дипина, введенного интратестикулярно, оказался недостаточным, чтобы вызвать глубокие изменения в наследственных структурах ССК.

Между тем обращает на себя внимание тот факт, что на протяжении всего эксперимента в обоих случаях (дипин или физиологический раствор) выход мейотических микроядер был существенно выше частоты встречаемости сперматогониальных микроядер. И это при том, что как сперматогонии, так и ранние постмейотические клетки несут свое происхождение от клеток, которые в момент экспериментальных воздействий находились на стадии ССК. Условно можно предположить, что какой-то фактор, скорее, эпигенетической природы, резко ослабляет работу репарационных ферментов и клеточного отбора в мейозе, в результате чего определенная доля клеток с потенциальными, скрытыми разрывами хромосомных нитей выявляется на постмейотических стадиях развития в виде округлых сперматид со следами хромосомных поломок.

С другой стороны, мутагенное действие дипина проявилось в существенном увеличении частоты встречаемости спермиев с аномальной формой головок на 35-е сут фиксации. Увеличение доли aberrантных форм в популяции тестикулярных спермиев обычно рассматривается как морфологическое выражение точечных генных мутаций, микроделеций, или даже крупных структурных перестроек хромосом, вызываемых химическими и физическими мутагенами в премейотических и/или ранних мейотических клетках. Поскольку высокую частоту возникновения тестикулярных спермиев с аномальной формой

головок мы наблюдали в семенниках только на 35-е сут последействия, то, согласно данным по кинетике сперматогенеза у мышей, можно заключить, что высокую генетическую чувствительность к действию дипина обнаружили недифференцированные сперматогонии типа $A_{\text{групповые}}$ и/или дифференцирующиеся сперматогонии типа A_1 , но не ССК, так как на 56-е и 100-е сут фиксации число спермиев с аномальной формой головок уже не выходило за положенные пределы.

К сказанному следует добавить, что на 35 сут после действия дипина в популяции КС обнаруживались клетки с 4, 5 гетерохроматиновыми глыбками, что указывает на изменение метаболической активности КС. Установленный факт коррелирует с катастрофическими потерями практически всех типов сперматогенных клеток в данный момент времени. Интересно, что эти наблюдения противоречат данным, которые показали, что у мышей, подвергшихся внутрибрюшинному действию дипина (30 мг/кг), на 35 сут фиксации выявляется одно ядрышко, окруженное всегда одной (20%) или двумя (80%) гетерохроматиновыми глыбками (Маршак и др., 2002).

В целом, полученные в настоящей работе данные хорошо согласуются с результатами, которые недавно были представлены в одной из статей канадских исследователей (Marson et al., 2011). Эти авторы показали, что после длительной комбинированной обработки трансгенных крыс противоопухолевыми агентами блеомицином, этопозидом и цисплатиной (внутрибрюшинное введение) почти вдвое уменьшался вес семенников, сильно нарушался сперматогенез и, соответственно, снижалась продукция сперматозоидов. Они увидели, что в первую очередь сильно страдали прогениторные сперматогонии типа $A_{\text{групповые}}$ и несколько в меньшей степени сперматогонии типа $A_{\text{спаренные}}$ и стволовые сперматогониальные клетки. Однако за счет активности выживших стволовых клеток через 9 недель сперматогенез восстанавливался до контрольного уровня.

В общей стратегии репродуктивной токсикологии и вспомогательных репродуктивных технологий анализ качества семени занимает важное место. Причем одно из главных требований при таком анализе – изучение целостности

ядерного материала зрелых сперматозоидов. Другими словами, при оценке оплодотворяющей способности спермиев важным параметром является степень конденсации / деконденсации хроматина (гаметического ДНП-комплекса). У плацентарных млекопитающих и человека во время созревания сперматид пространственная реорганизация хроматина сопровождается синтезом и накоплением спермиоспецифических, протаминоподобных белков, богатых аргинином и цистеином. Вновь синтезируемые высокоосновные белки, замещая фракции гистонов соматического и мейотического типов, участвуют в специфической укладке молекулы ДНК. Конденсация и стабилизация хроматина спермиев идет за счет образования огромного числа дисульфидных мостиков, формирование которых почти полностью завершается в головном отделе эпидидимиса. Перекрестные S-S-связи, образующиеся между соседними протаминоподобными белками, обеспечивают высокую устойчивость инактивированного отцовского генома к действию разнообразных физических и химических факторов, сохранение его целостности во время прохождения спермиев по сложным путям мужской и женской репродуктивных систем. Нарушения процесса смены основных ядерных белков в спермиогенезе, дефекты во взаимодействии ДНК-белок, а также гиперацетилирование гистонов, разрывы хромосомных нитей могут приводить к структурным аномалиям в хроматине сформировавшихся спермиев. «Незрелость» гаметического ДНП-комплекса в дальнейшем может сильно отразиться на процессе деконденсации хроматина, являющимся неременным условием для образования мужского пронуклеуса, репликации, конденсации хромосом, формирования жизнеспособной зиготы (Dadoune, 1995, 2005; Chapman, Michael, 2003; Laberge, Boissonneault, 2005; D'Oscchio et al., 2007). Как явствует из наших наблюдений, на протяжении всего эксперимента, как в опыте, так и в контроле, соотношения недеконденсированных (устойчивых), частично и полностью деконденсированных ядер в популяции зрелых мышинных сперматозоидах после комбинированной обработкой НДС / ДТТ, практически были одинаковыми. Однако в обоих случаях при выбранных условиях эксперимента эти соотношения резко отличались от результатов анализа

процесса деконденсации ядерного хроматина в зрелых гаметах интактных животных. Преобладание же в изученных контрольных и опытных образцах недеконденсированных ядер объясняется, скорее всего, суперстабилизацией хроматина за счет образования огромного числа дополнительных дисульфидных мостиков. Так, рядом исследователей (Johansson, Pellicciari, 1988; Hernandez-Ochoa et al., 2006) было обнаружено, что длительное воздействие на самцов мышей неорганическим свинцом усиливало процессы конденсации и стабилизации ядерного материала в спермиях, о чем свидетельствовала высокая устойчивость к деконденсации гаметического хроматина в условиях *in vitro*. По данным Эрнандеса-Очоа с соавт. (Hernandez-Ochoa et al., 2006), в контроле после обработки спермиев в растворе НДС/ДТТ в течение 30 мин примерно 98% ядер подверглись полной деконденсации и только 2% ядер проявляли устойчивость. В то же время в опыте 41% ядер зрелых гамет не были чувствительны к действию деконденсирующего агента: полной и частичной деконденсации подверглись 40 и 18% ядер, соответственно. Авторы (Johansson, Pellicciari, 1988; Hernandez-Ochoa et al., 2006) единодушны, считая, что во время прохождения спермиев по эпидидимису Рb проникает в ядерный материал и вступает во взаимодействие с ДНК-белок комплексом, образуя в нем S-Pb-S-связи, которые и могут препятствовать нормальному процессу деконденсации хроматина. Согласно наблюдениям Сойера и Брауна (Sawyer, Brown, 2000), противоопухолевый агент циклофосфамид при хроническом воздействии на крыс в течение 6 нед в дозе 5.1 мг/кг, не вызывая изменений в весах семенников и эпидидимисов, а также в числе образующихся спермиев, значительно подавлял процесс деконденсации хроматина зрелых гамет *in vitro*.

Тот факт, что на отдаленных сроках последействия (35, 56 и 100-е сут фиксации) большое число зрелых спермиев оставалось нечувствительными к действию деконденсирующего агента, может быть обусловлен пролонгированными, возможно, необратимыми нарушениями функциональной и топологической целостности КС, вызванными повреждающим действием интратестикулярных инъекций дипина или физиологического раствора. Как

известно, нишеобразующие КС играют большую роль в развитии сперматогенных клеток, в том числе находящихся на постмейотических стадиях созревания. Хули с соавт. (Hooley et al., 2011) показали, что интратестикулярное введение мышам аденовирусного вектора, несущего трансген GFP (зеленый флуоресцентный белок), который экспрессировался исключительно в цитоплазме клеток Сертоли, приводило к нарушениям функции этих клеток и, как следствие, дезинтеграции сперматогенного эпителия в части семенных канальцев. Чапман и Майкл (Chapman, Michael, 2003) выдвинули гипотезу, согласно которой андрогенсвязывающий белок (АСБ), секретируемый КС и транспортируемый через rete testis в эпидидимис, может опосредовано участвовать в сложных биохимических процессах, связанных с окислением тиольных (-SH) групп цистеина, конденсацией / деконденсацией хроматина в сперматозоидах крыс. Снижение уровней АСБ, в свою очередь, может вызывать качественные дефекты мужских гамет. С другой стороны, мы не исключаем, что в основе выявленных нами изменений в характере деконденсации гаметического хроматина могут лежать вызванные механическими повреждениями (травмой) семенника какие-то эпигенетические изменения в самой системе развития мужских половых клеток. Эти, так называемые «эпимутации», не уступающие по эффективности истинным мутациям, способные сохраняться на протяжении нескольких клеточных поколений и даже наследоваться, в состоянии спровоцировать катастрофические изменения в процессах синтеза и накопления спермиоспецифических белков, их взаимодействий с молекулой ДНК (Zamudio et al., 2008; Rajender, Agarwa, 2011).

Потеря способности к деконденсации ядер зрелых сперматозоидов, которые в момент интратестикулярных инъекций находились на промежуточных стадиях спермиогенеза, когда хроматин сперматид открыт, активен и претерпевает конформационные изменения (14-е сут фиксации), либо находились в точке перехода из семенников в эпидидимис (7-е сут фиксации), могла быть вызвана механическими повреждениями гемато-тестикулярного и гемато-эпидидимального барьеров. Обычно повреждения этих барьерных структур

открывают возможности для проникновения в сперматогенную систему огромного числа химических веществ, многие из которых обладают генотоксической активностью. В одной из ранних работ Киу с соавт. (Qiu et al., 1995) было показано, что хроническое воздействие (6 нед) на самцов крыс противоопухолевым агентом циклофосфамидом изменяло характер деконденсации ядер эпидидимальных гамет в условиях *in vitro*. По мнению авторов, изменения в процессе декомпактизации хроматина могли происходить в результате алкилирования основных ядерных белков или ДНК, либо в результате образования сшивок между этими макромолекулами под влиянием метаболитов циклофосфамида – горчичного фосфорамида и акролеина.

Таким образом, несмотря на то, что в нашем исследовании, как в контроле, так и в опыте процесс сперматогенеза по морфогистологическим, количественным и цитогенетическим характеристикам восстанавливался, способность к деконденсации ядерного хроматина эпидидимальных спермиев оказалась нарушенной на протяжении всего эксперимента.

Ш.2. Культивирование клеток Сертоли

Комплексно изучено поведение КС половозрелых мышей в культуре. На 3 сут культивирования клетки начинали распластываться, располагались отдельно (рис. 18 а). К 6 сут культивирования КС образовывали фокусы роста (рис.18 б). С 9 сут культивирования КС начинали формировать колонии (рис. 18 в). А к 12 сут клетки в культуре представляли однородный слой (рис. 18 г).

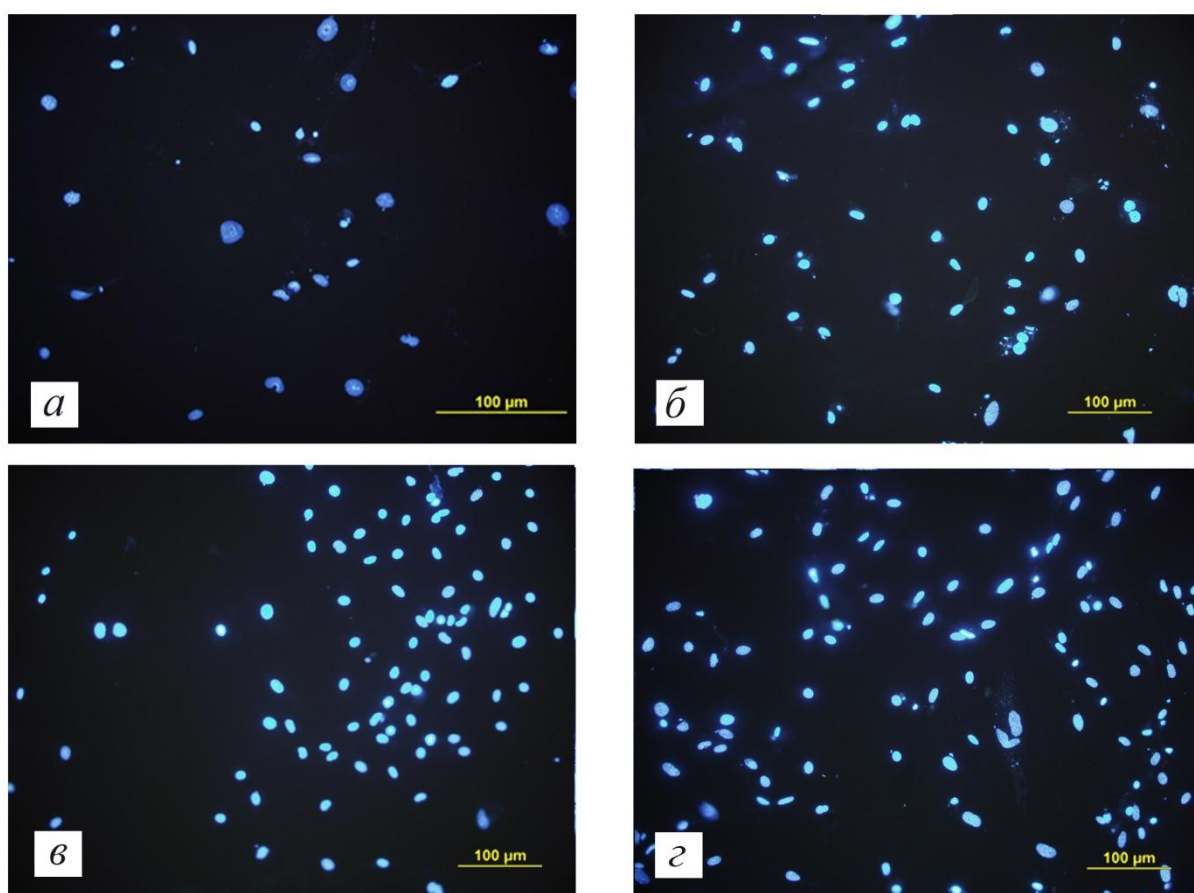


Рис. 18. Культура КС на 3 сут (а), 6 сут (б) 9 сут (в) и 12 сут (г).

Общий вид.

Окраска: DAPI.

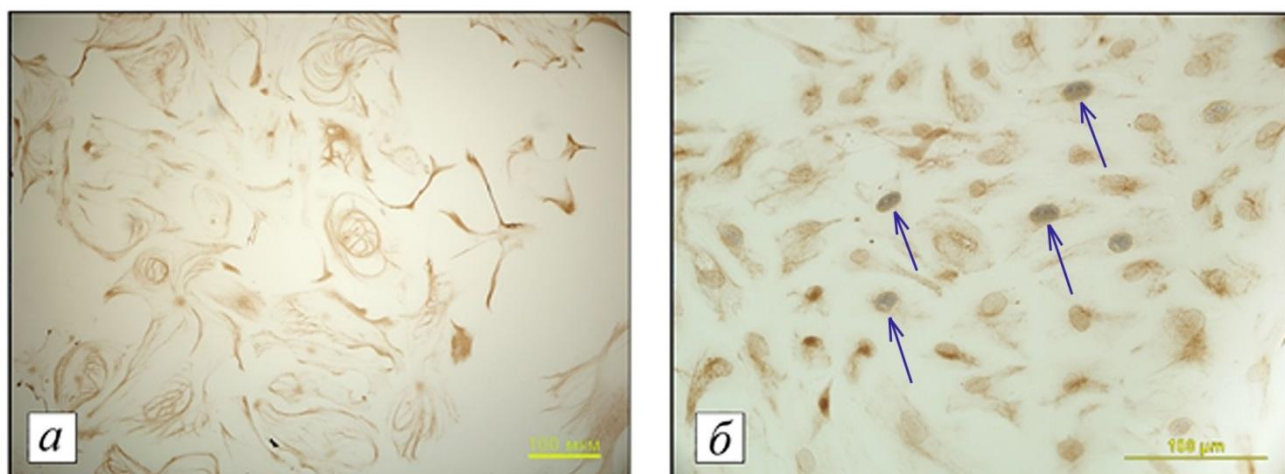


Рис.19. Культура КС на 9 сут (а) и 12 сут (б).

а - *vimentin*+ -клетки (коричневая цитоплазма);

б - *vimentin*+/*BrdU* -клетки (коричневая цитоплазма / серые ядра, указанные стрелками).

Число *vimentin*+ -клеток на 3 сут *in vitro* составляло 72%, а число *vimentin*+/*BrdU*+ -клеток - 14% (рис. 19, 21). (*Vimentin* – белок цитоскелета, экспрессируемый КС, а также перитубулярно-мышечными клетками). Для более точной оценки числа КС иммуноцитохимически выявляли также *Wt1* (*Wilms tumor factor*), присутствующий в семенниках только в КС (рис. 20, 21). Число *Wt1*+ -КС в культуре на 3 сут составило только 24%; некоторые клетки, по морфологическим признакам относимые к КС, не экспрессировали его. Тем не менее, число *Wt1*+ -КС в культуре достоверно растет: с 24% на 3 сут до 58% на 20 сут (рис. 21). При этом увеличивается и содержание *vimentin*+ -клеток с 72% на 3 сут до 96% на 20 сут. Что касается *vimentin*+/*BrdU*+ -клеток, то динамика их изменения носила волнообразный характер, на 12 сут пришелся максимум пролиферации клеток в культуре, так как на 20-е сут число *BrdU*+ -клеток снизилось до 21%. Двойное окрашивание на *Wt1* и *BrdU* показало, что большая часть *BrdU*+ -клеток являются также *Wt1*-положительными, что достоверно подтверждает пролиферацию именно КС.

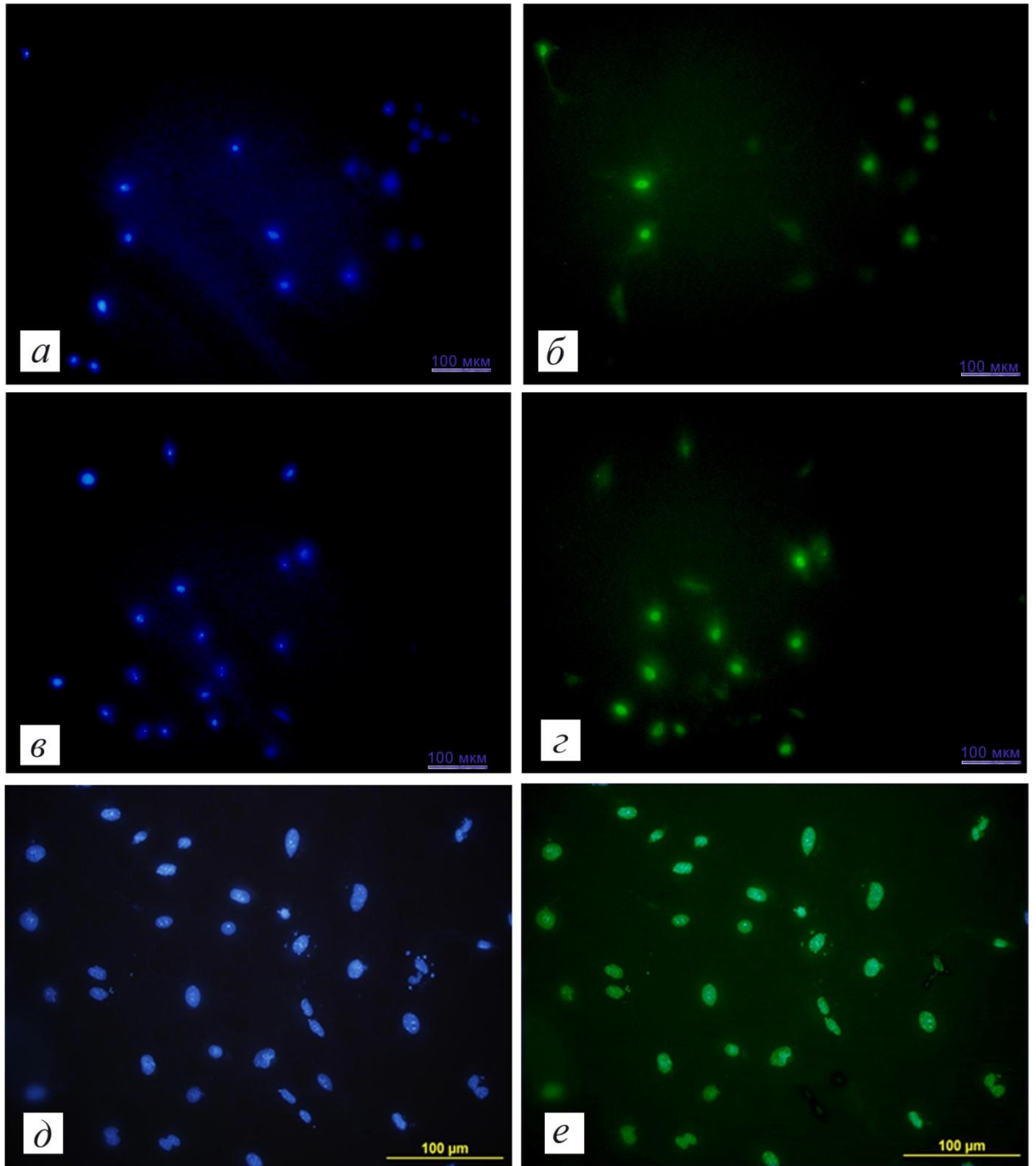


Рис.20 . Последовательное иммуноцитохимическое окрашивание DAPI и антителами к Wt1 (Wilms tumor 1) на 3 сут (а, б), 6 сут (в, г) и 12 сут (д, е) культивирования.

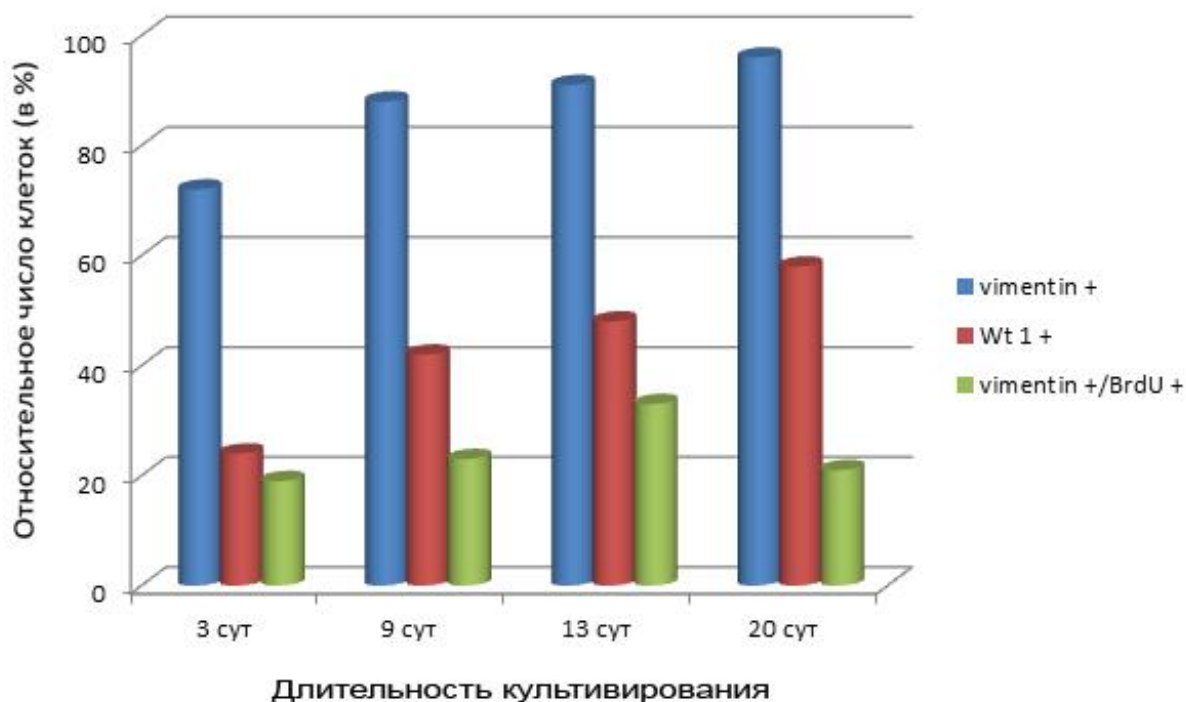


Рис.21. Динамика изменения числа клеток, экспрессирующих маркеры КС (*vimentin*, *Wt1*), а также включающих *BrdU*, в % от общего числа клеток в культуре, ($3,5 \cdot 10^5$ кл/см²).

Анализ КС, окрашенных для выявления ядрышковых белков (серебрение) и ДНК (реакция Фельгена), показал, что на 3 сут культивирования популяция КС (определяемая по экспрессии специфических маркеров) представлена двумя типами клеток (рис. 23, рис. 24). Существуют КС с типичной для них *in vivo* организацией ядра (рис. 23 а, б, д; рис. 24), но среди них уже достаточно много двуядерных (рис. 23 в, е), КС с микроядрами и протрузиями (рис. 23), а также тетра- и октаплоидных ядер (рис. 23 а, д; рис. 24 в, г), что, в свою очередь, не характерно для КС половозрелых самцов *in vivo*.

Подсчет числа КС с разным числом ядрышек выявил на 3 сут культивирования значительное снижение числа одноядрышковых КС, в сравнении с КС взрослых животных *in vivo* (рис. 22). При этом число ядрышек в некоторых КС увеличивается до 8-9. На 12 и 20 сут культивирования в культуре

чаще встречаются полиплоидные ядра, число ядрышек в некоторых клетках увеличивается до 14.

Изменялась и организация околядрышкового хроматина (рис. 24, 25): в культуре на 3 сут преобладали клетки с одной гетерохроматиновой глыбкой в ядре, при этом значительно расширился спектр ядер, содержащих более двух гетерохроматиновых глыбок (до 30 глыбок).

Цитофотометрические измерения содержания ДНК-фуксина в клетках Сертоли выявили наличие ди-, тетра и октаплоидных ядер, значительно различающихся по размеру (рис. 26).

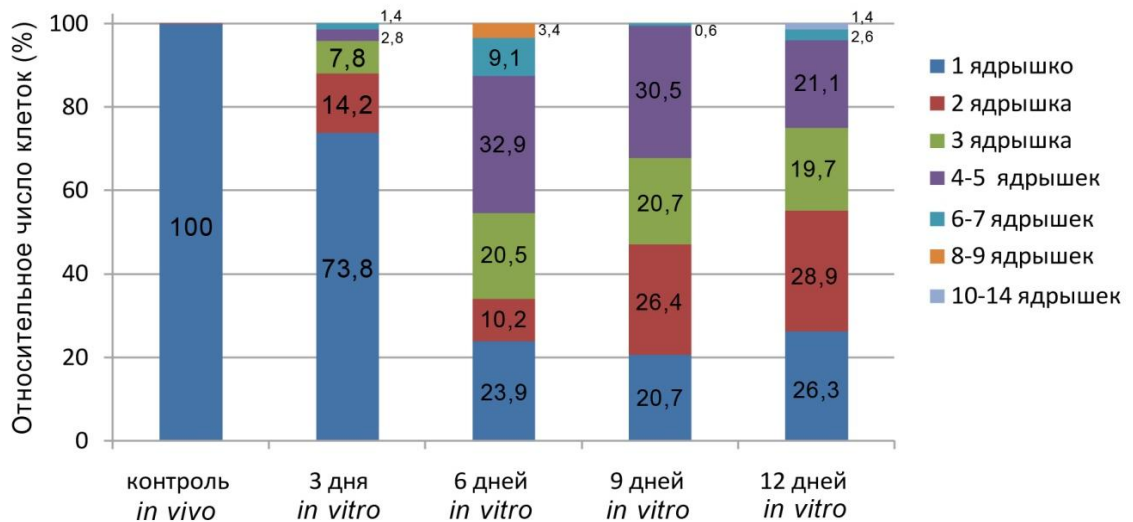


Рис.22. Соотношение числа клеток Сертоли с разным числом ядрышек.

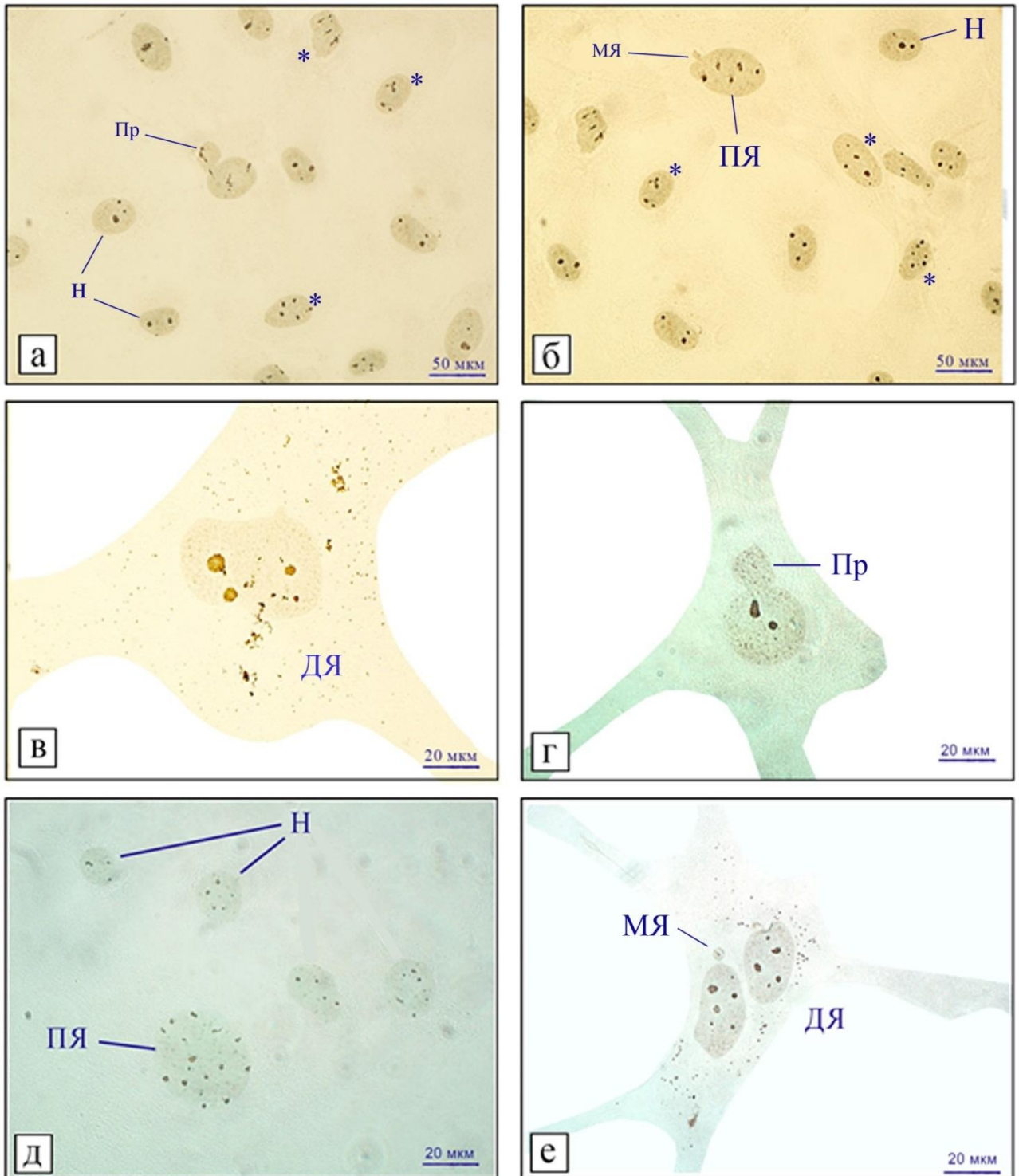


Рис.23. Клетки Сертоли на 3 сут (в-е) и 6 сут (а,б) культивирования.

Обозначения: ДЯ - двуядерная КС, МЯ – микроядро, Н - КС с организацией ядра, характерной для КС *in vivo*, Пр – протрузия, ПЯ - полиплоидное ядро КС,

* - КС с измененной организацией ядер.

Окраска: серебрение, метиловый зеленый.

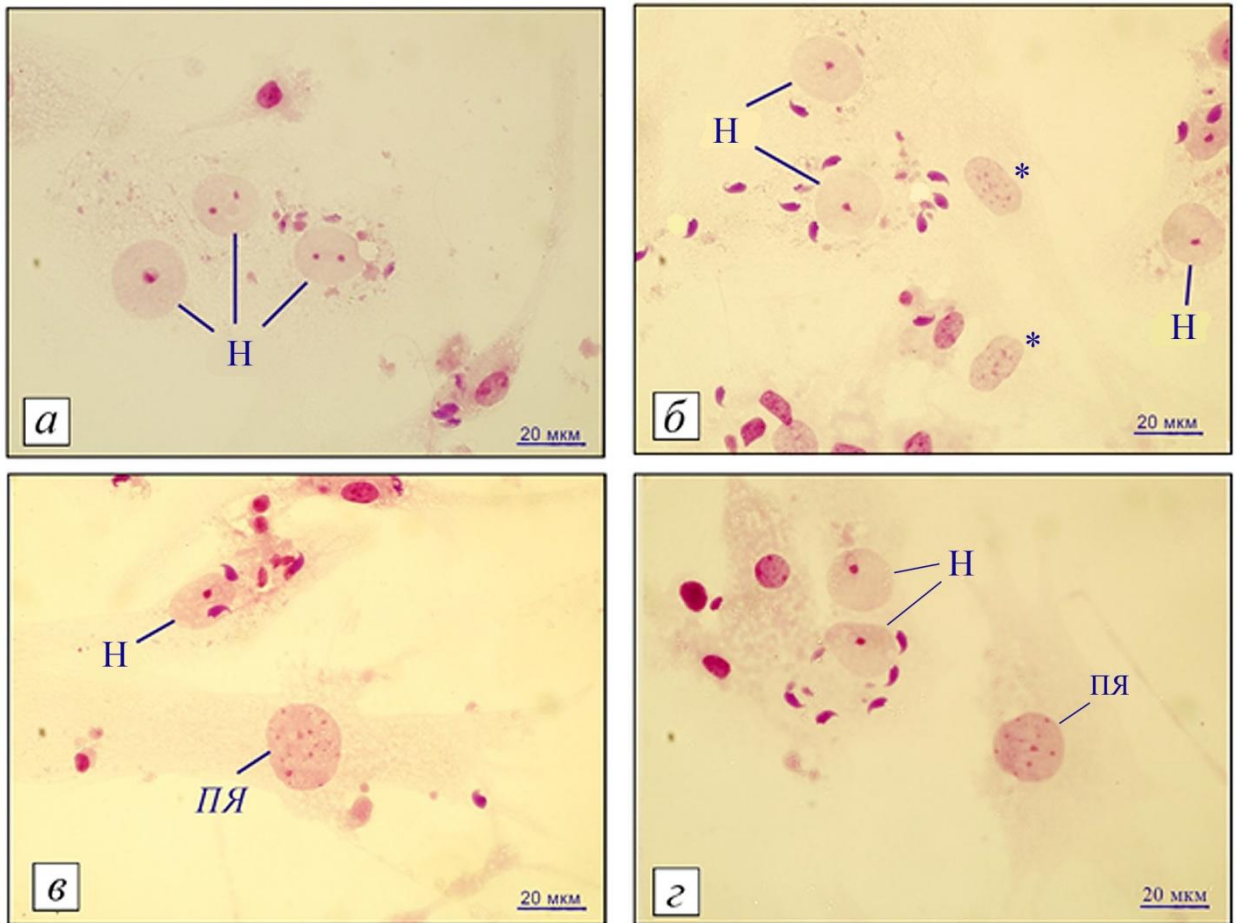


Рис.24. Клетки Сертоли в культуре на 3(а, в) и 6(в, г) сут культивирования.
Обозначения: Н – КС с организацией ядра, характерной для КС *in vivo*, ПЯ – полиплоидные ядра клеток, * – КС с измененной организацией ядра.

Окраска: по Фельгену.

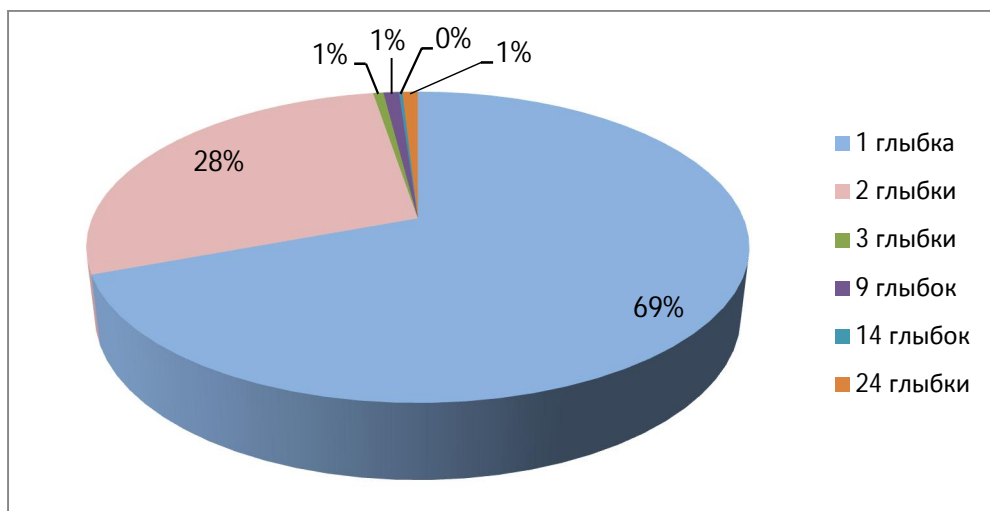


Рис.25. Соотношение количества клеток Сертоли с разным числом гетерохроматиновых глыбок к 3 сут пребывания в культуре.

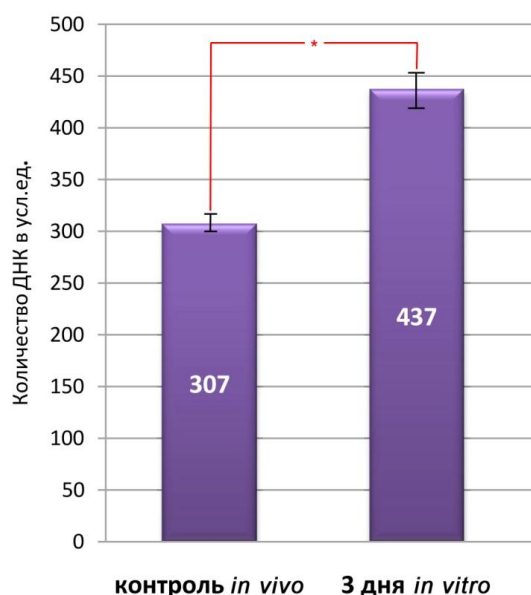


Рис.26. Содержание ДНК-фуксина в КС.

Примечание: * - различия по сравнению с контролем статистически достоверны при $p \leq 0,05$.

Итак, для исследования культуры КС в настоящей работе использованы условия культивирования, при которых в предварительных экспериментах была достигнута наибольшая пролиферативная активность КС, выделенных из семенника половозрелых животных (Ahmed et al., 2009; Chui et al., 2010; Малолина, Кулибин, 2011). Наши исследования с использованием двойного комбинированного окрашивания *vimentin+*/*BrdU+* и *Wt1+*/*BrdU+* подтвердили способность КС, полученных из гонад 2-3 мес. мышей линии C57Bl/6, пролиферировать в условиях культивирования. Причем максимум пролиферации приходится на 12 сут, а к 20 сут пролиферативная активность падает, что вероятно, связано с контактным торможением пролиферации, т.к. к этому сроку клетки формируют монослой.

Также выявлено снижение числа *Wt1+*-клеток на ранних сроках культивирования. Это может быть связано с их культивированием при повышенной температуре (+37°C, а не 33°C, как в семенниках). Также одно из объяснений этого явления, возможно, кроется в установленном в настоящем исследовании факте существенной реорганизации ядер части КС, уже начиная с 3

сут культивирования. Уже с 3 сут культивирования КС разделяются на два типа: 1) с типичной для них в условиях *in vivo* организацией ядра (круглое ядро, одно ядрышко, окруженное двумя, реже тремя-четырьмя гетерохроматиновыми глыбками (Guttenbach et al., 1996); 2) клетки чаще с овальным, вытянутым ядром с несколькими ядрышками и более чем пяти гетерохроматиновыми глыбками.

Более того, среди культивируемых КС весьма часто встречались двуядерные клетки, клетки с ядерными протрузиями и микроядрами. Цитофотометрические измерения содержания ДНК-фуксина показали, что КС активно пролиферируют. При этом митотический цикл у части клеток не завершается кариотомией (тетраплоидные ядра), либо цитотомией (двуядерные клетки). Тетраплоидные ядра вступают в синтез ДНК, давая октаплоидные ядра, причем на 12 и 20 сут культивирования в некоторых полиплоидных КС число ядрышек увеличивалось до 14. То есть КС в условиях *in vitro* ведут себя как полиплоидизирующаяся клеточная популяция. Разделение КС в культуре на две субпопуляции также было отмечено в одной из работ польских исследователей (Krzanowska, Bilińska, 2000).

Возможность перехода КС к делению в условиях *in vitro* Ахмед и др. в своей работе (Ahmed et al., 2009) объясняют изменениями в КС на молекулярном уровне: во время пролиферации культивируемых «взрослых» КС уменьшается продукция ингибитора клеточного цикла белка P27^{kip1}, и одновременно увеличивается количество индуктора пролиферации белка ID, который снимает запрет на размножение. Сходные результаты представлены и в работе Чаудри (Chaudhary et al., 2005). В последние годы пролиферативная активность КС в культуре показана и у КС, выделенных из семенников половозрелых петухов (Guibert et al., 2011), половозрелых быков (Tajik et al., 2012) и даже старых мужчин (Chui et al., 2011).

Также стоит упомянуть работу Кодани и Кодани (Kodani, Kodani, 1966), которая, является первым опытом длительного культивирования КС млекопитающих и первым доказательством возможности деления этих клеток в

условиях *in vitro*. Подробно были описаны митозы в культивируемых КС, причем небольшое число КС, как считают авторы, делилось по механизму амитоза.

В контексте полученных в нашей работе данных, нельзя также не отметить исследование, в котором было обнаружено (Schulze, Schulze, 1981), что в семенниках пожилых мужчин, страдавших карциномой простаты, образовывались многоядерные КС. По мнению авторов, при некоторых болезнях, связанных со старением, КС могут возобновлять деления.

Что касается появления в культуре двух типов КС, то, скорее всего, это отражает существование в норме гетерогенности в популяции КС.

Ш.3. Трансплантации сперматогенной ткани под капсулу почки

Через 4 нед после трансплантации под почечную капсулу кусочков семенников 3-дневных мышат, в трансплантатах наблюдали развитие сперматогенного процесса (рис. 27). У всех трех животных трансплантаты прижились, на гистологических срезах присутствовали семенные каналцы с различной организацией сперматогенного эпителия (рис. 27 в-е). Встречались каналцы, содержащие только КС и сперматогонии (рис. 27 в). В большинстве каналцев присутствовали сперматоциты I порядка (рис. 27 г-е). На базальной мембране наблюдались деления сперматогониальных клеток (рис. 27 г). На клеточном уровне часто прослеживались нарушения: цитоплазматические и ядерные вакуоли, межклеточные пространства, клетки с пикнотическими ядрами (рис. 27 г-е). Интерстициальная ткань местами была инфильтрована лимфоцитами. Они проникали иногда также и в некоторые каналцы.

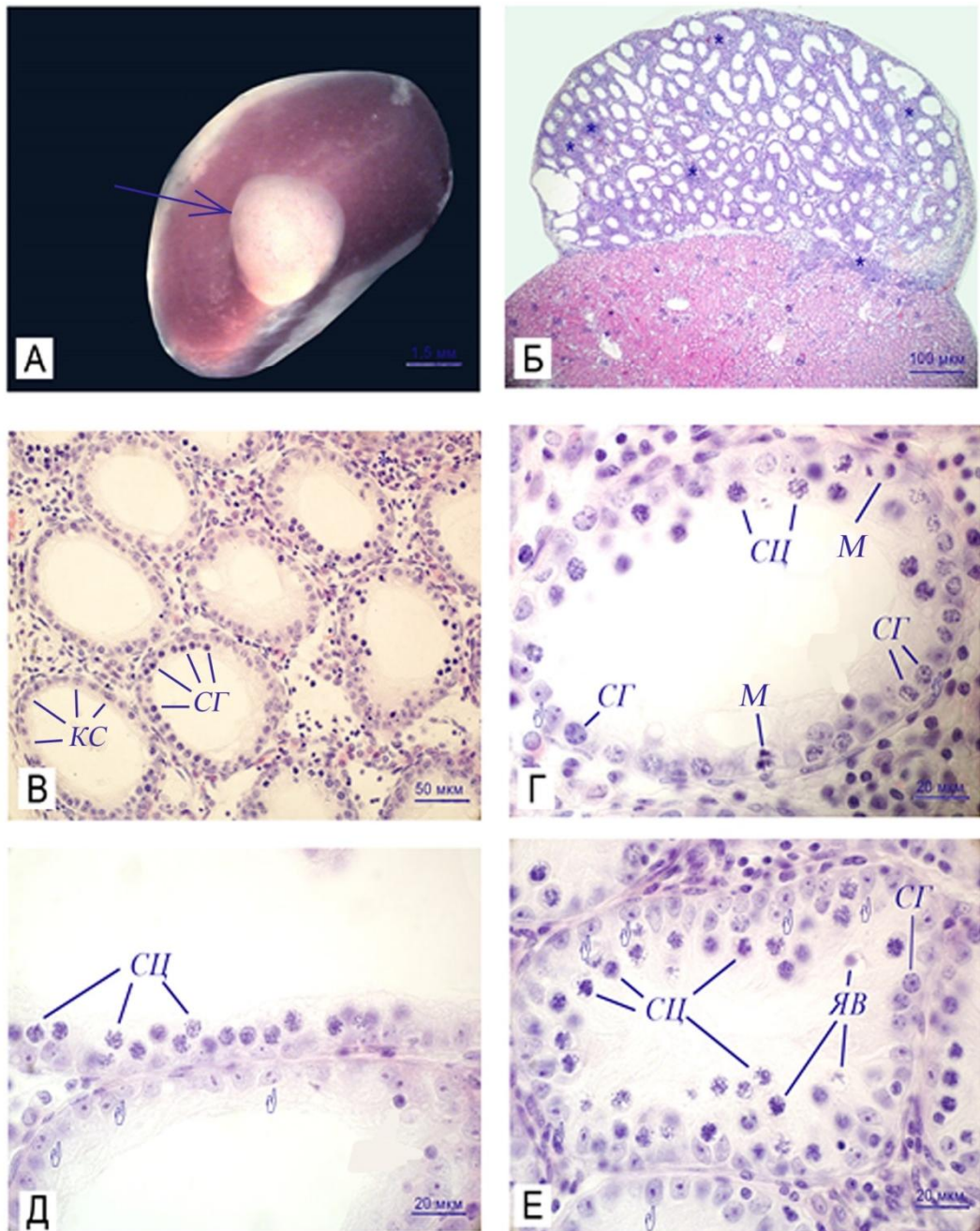


Рис. 27. Общий вид (а) и срезы (б-е) трансплантатов семенных канальцев 3-х дневных мышей через 4 недели после помещения под капсулу почки.

*Обозначения: Д – деление клетки, СГ – сперматогонии, СЦ – сперматоциты, ЯВ – ядерные вакуоли, ☞ - КС, * - скопление клеток иммунной системы.*

Стрелкой показан трансплантат.

Окраска: гематоксилин – эозин.

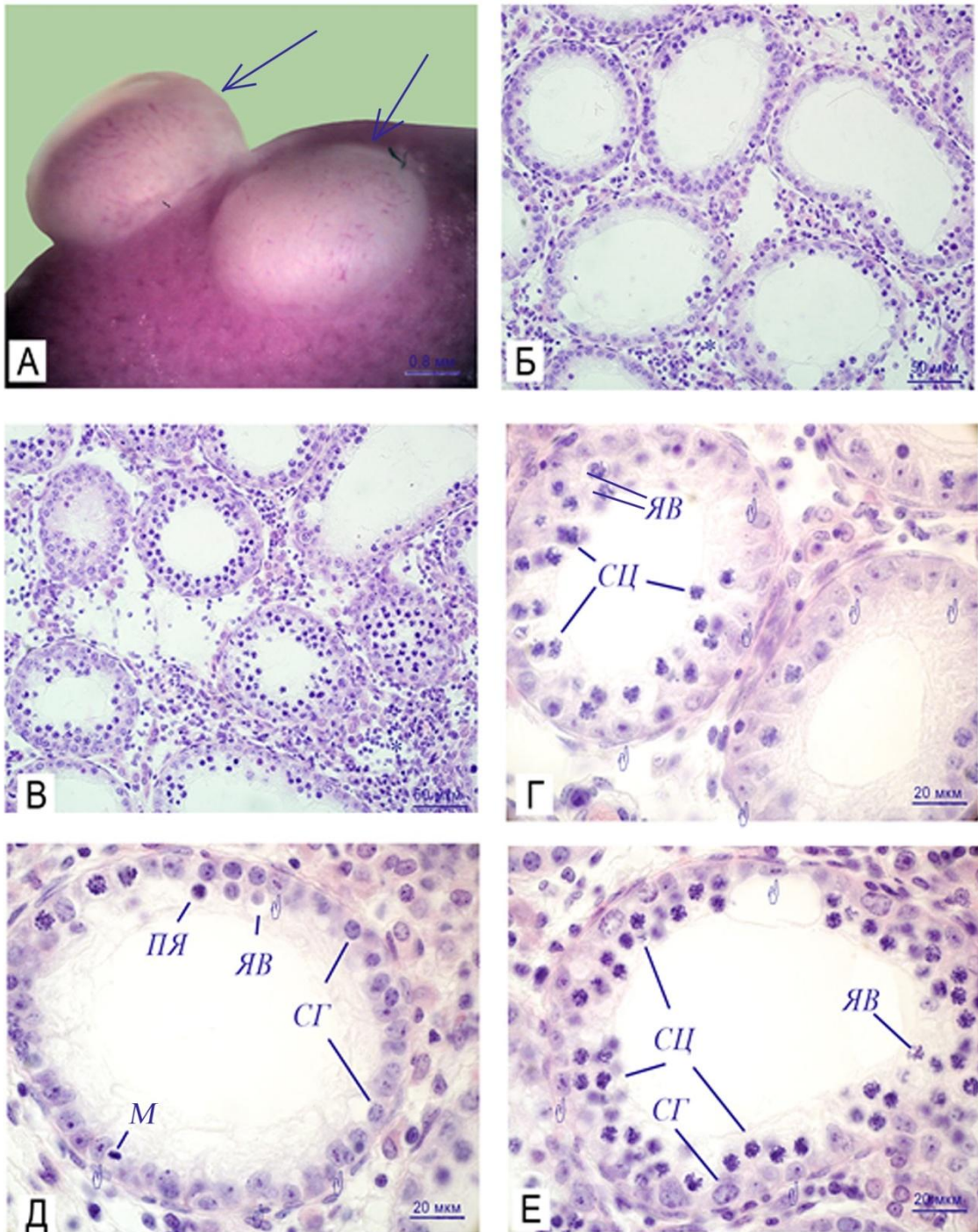


Рис. 28. Общий вид (а) и срезы (б-е) трансплантатов кусочков семенника 3-х дневных мышей через 4 недели после помещения под капсулу почки.

Обозначения: М – метафазная клетка, СГ – сперматогонии, СЦ – сперматоциты, ПЯ – пикнотические ядра, ЯВ – ядерные вакуоли,

☞ - КС. Стрелками показаны трансплантаты.

Окраска: гематоксилин – эозин.

Результат трансплантации отдельных семенных канальцев 3–дневных мышат повторил результат предыдущего опыта (рис. 28).

Через 4 нед после трансплантации под почечную капсулу суспензии клеток, полученной из семенников 3–дневных мышат, у всех трех животных обнаруживались новообразованные семенные канальцы (рис. 29 а-г). Их диаметр составлял от 10 до 150 мкм. Во всех канальцах присутствовали КС (рис. 29 а, б, в), а в некоторых также клетки, похожие на сперматогониальные (рис. 29 а, б). Интерстициальная ткань была инфильтрована лимфоцитами (рис. 29 б-г), которые часто проникали в семенные канальцы.

Через 4 нед после трансплантации под почечную капсулу кусочков семенников или отдельных канальцев взрослых мышей (2,5 мес) во всех трансплантатах присутствовали семенные канальцы, лишенные половых клеток (рис. 30). Большинство канальцев имели неправильную форму и были уменьшены в диаметре (рис. 30 а). Внутри канальцев наблюдались только КС (рис. 30 в), часть которых оставалась прикрепленной к базальной мембране, остальные находились в просвете канальцев. В месте трансплантации проходила воспалительная реакция. Внутри некоторых канальцев проникали лимфоциты (рис. 30 а). Через 10 нед почти все КС уже переместились в просвет канальцев (рис. 30 б, г).

Через 4 нед после трансплантации под капсулу почки суспензии клеток, полученной от половозрелых самцов (2,5 мес), развития сперматогенного эпителия не происходило (рис. 29 д, е). На месте операции под почечной капсулой шла локальная воспалительная реакция; структур, подобных семенным канальцам отмечено не было.

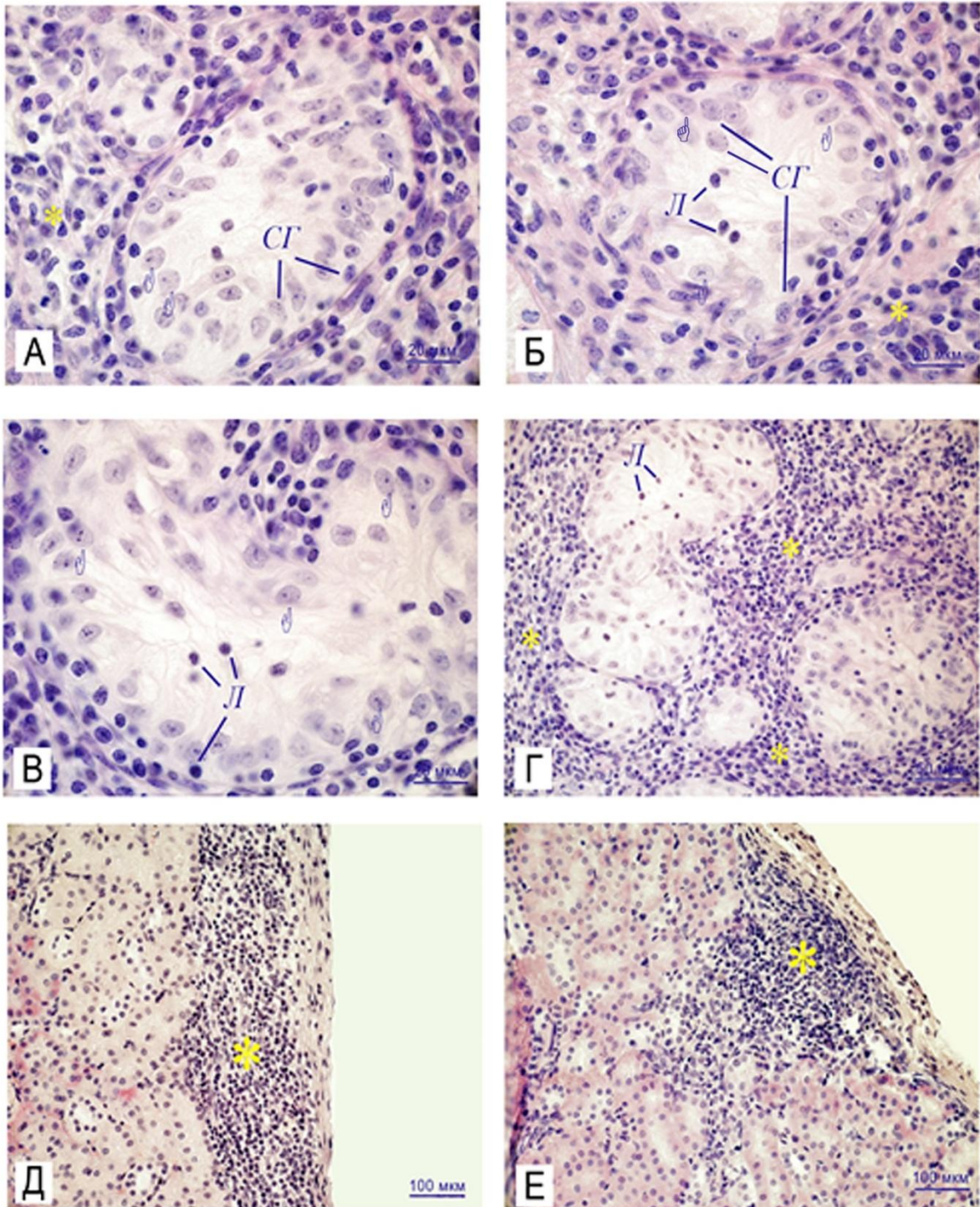


Рис. 29. Срезы трансплантатов, образовавшихся через 4 нед после введения суспензии клеток семенников от новорожденных (а-г) и взрослых (д, е) мышей.

*Обозначения: Л - лейкоциты в просвете канальцев, CG –сперматогонии, ☞ - КС, * - скопление клеток иммунной системы.*

Окраска: гематоксилин – эозин.

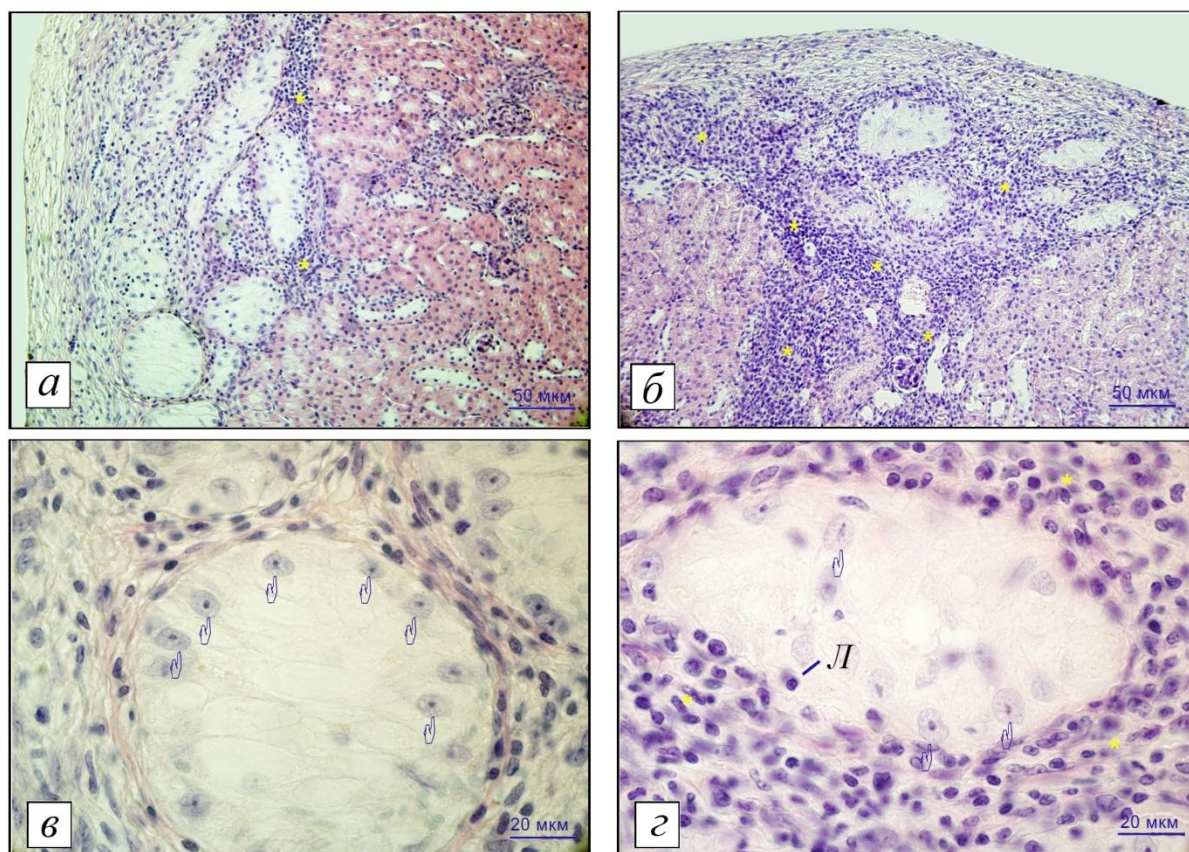


Рис.30. Срезы трансплантатов сперматогенного эпителия взрослых мышей через 4 (а,в) и 10 (б,г) недель после помещения под почечную капсулу.

Обозначения: Л - лейкоциты в просвете канальцев,

☞ - клетки Сертоли, * - скопление клеток иммунной системы.

Окраска: гематоксилин - эозин

Через 4 нед после трансплантации отдельных канальцев или кусочков семенников половозрелых животных, которым за 14 сут до этого был внутрибрюшинно введен дипин, на гистологических срезах обнаруживались семенные канальцы, содержащие КС (рис. 31). Канальцы были окружены интерстициальной тканью, не обнаруживающей каких-либо признаков нарушения. При этом через 10 нед сохранность канальцев и КС в них в обоих экспериментах оставалась прежней.

Через 4 нед после трансплантации КС, культивированных *in vitro* в течение 12 дней, происходило образование канальцеподобных структур, содержащих клетки, которые по морфологии соответствовали КС (рис. 32).

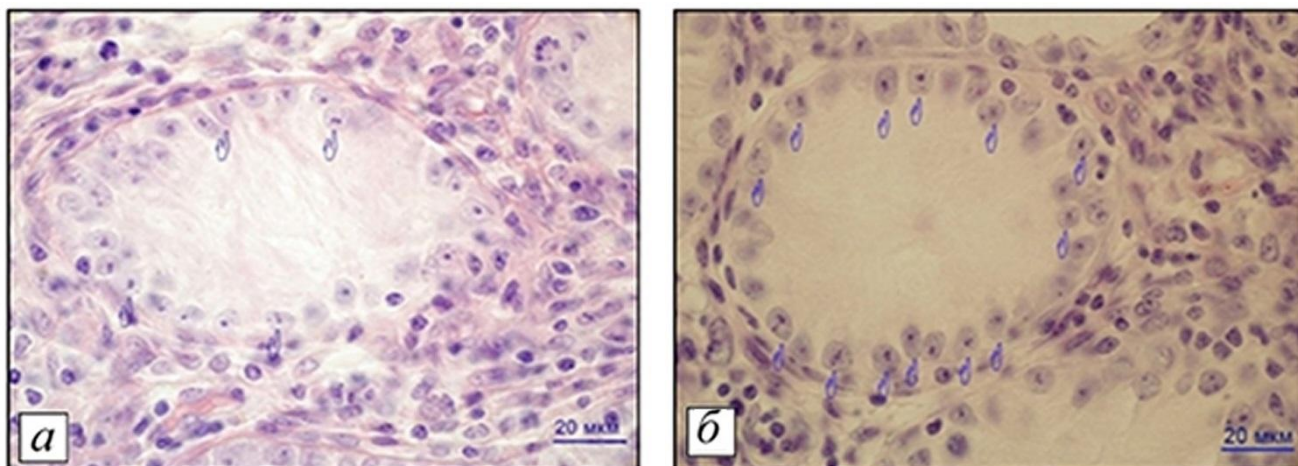


Рис.31. Срезы трансплантатов семенных канальцев, взятых от взрослых мышей через 14 дней после введения дипина, через 4 нед после помещения под почечную капсулу.

Обозначения: ☞ - КС.

Окраска: гематоксилин – эозин.

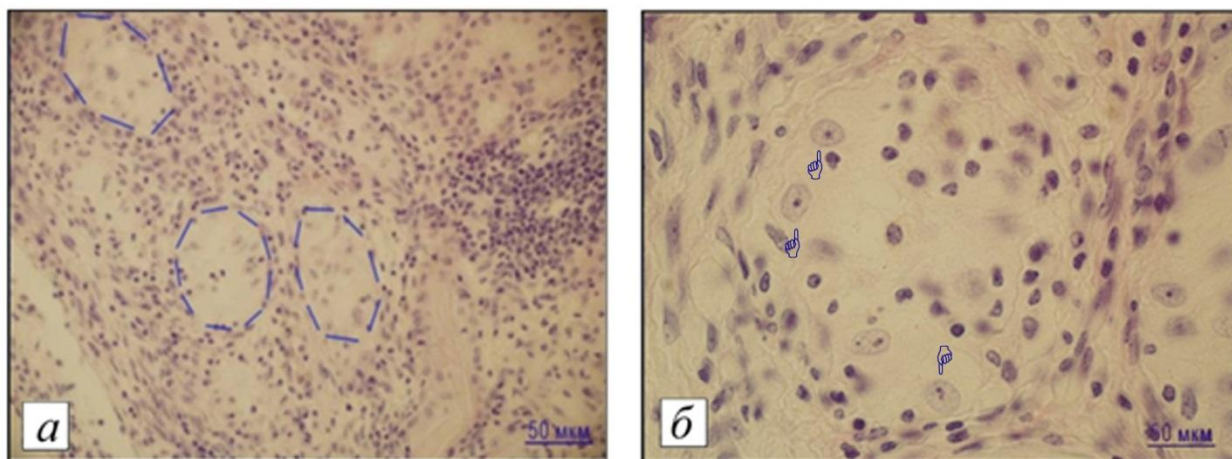


Рис. 32. Срезы трансплантата культуры КС (12 дней *in vitro*) через 4 нед после введения под капсулу почки. Обведены канальцеподобные структуры.

Обозначения: ☞ - КС.

Окраска: гематоксилин – эозин.

Анализируя результаты трансплантационных экспериментов, как и предполагалось (Kim et al., 2007), наиболее успешной оказалась трансплантация фрагментов семенника и изолированных клеток от новорожденных животных. Развитие половых клеток доходило до стадии сперматоцитов I порядка, что характерно для сперматогенного процесса на соответствующей стадии онтогенеза. Следовательно, ранние половые клетки (гоноциты) новорожденных животных сохраняют заложенную в них программу развития даже при перенесении в эктопические условия. Менее отчетливые, но обнадеживающие результаты получены при подсадке изолированных клеток. Образовывались отдельные семенные каналцы. Такие же результаты были ранее получены и в других работах (Dufour et al., 2002; Gassei et al., 2006). Однако в наших опытах интерстициальная ткань была инфильтрована лимфоцитами, и в семенных каналцах присутствовали КС и сперматогониальные клетки. Развитие реакции отторжения, скорее всего, обусловлено тем, что реципиентами являлись мышши-гибриды C57/Bl6, а не иммунодефицитные мыши. Присутствие в просветах каналцев КС и сперматогониев также может быть следствием лимфоидной инфильтрации, так как клетки иммунной системы подавляют развитие именно половых клеток. Вместе с тем, в дальнейшем может произойти как окончательное отторжение трансплантата, так и развитие сперматогенеза, так как наблюдаемые через 4 недели процессы могут быть только началом восстановления архитектуры семенника, как это показано в других исследованиях, и половые клетки появятся, но на более поздних сроках фиксации (Kita et al., 2007).

Далее как показали наши наблюдения, при трансплантации фрагментов семенника взрослых животных каналцы сохраняли свою морфологию, но развитие половых клеток останавливалось. Введение под капсулу почки изолированных клеток семенника взрослых животных не приводило к развитию сперматогенного процесса.

Сопоставление результатов этих двух групп экспериментов указывает с большой долей вероятности на пролиферацию КС как основной фактор, определяющий способность к развитию и регенерации клеток сперматогенной

системы в эктопических условиях; тем более что в мировой литературе есть данные об успешных экспериментах с использованием ткани и клеток взрослых животных (Geens et al., 2006; Schlatt et al., 2006; Arregui et al., 2008 a).

Этот вывод мы проверили в опытах с введением под капсулу почки ткани семенников взрослых животных после экспериментального воздействия, стимулирующего КС к делениям. Для того чтобы вывести КС из состояния пролиферативного покоя, донорам за 14 дней до выделения клеток для трансплантации внутрибрюшинно вводили химический мутаген дипин (30 мг/кг) (Захидов, 1993). После трансплантации фрагментов семенников от этих животных, в просветах канальцев не наблюдали образования половых клеток, но размер и форма канальцев как через 4, так и через 10 недель, не отличались от нормальной. Кроме того, возможно, 10 недель недостаточно для полного восстановления сперматогенеза и необходимо дольше следить за развитием трансплантатов (Arregui et al., 2008 a). Также быстрой регенерации не способствовали уже описанное выше обстоятельство - линия мышей.

При трансплантации КС взрослых животных, культивируемых в течение 12 сут, происходила реконструкция канальцеподобных структур, конечно не так явно как это описано в работах по трансплантации культуры КС от новорожденных животных (Gassei et al., 2008). Таким образом, активация КС к делению является условием необходимым для развития сперматогенного процесса в эктопических условиях. По-видимому, для достижения развития сперматогенного эпителия в опытах такого типа, необходимо дополнительно активировать КС к делению, например, добавляя определенные ростовые факторы в культуру, или культивируя КС взрослых животных после экспериментальных воздействий – например, введение дипина (30 мг/кг).

Ш.4. Изучение последствий многократного действия наночастиц золота на развивающиеся мужские половые клетки у мышей

Ш.4.1. Гистологический анализ сперматогенеза

На 14 сут фиксации после многократного внутрибрюшинного введения суспензии наночастиц золота ($C=1 \times 10^{15}$ частиц/мл) морфогистологических отличий в организации сперматогенной системы между контрольной (рис. 33 а, б) и подопытной (рис. 33 в-е) группой не наблюдалось. На срезах встречались каналцы с нормальной структурой сперматогенного эпителия.

На 56 сут фиксации у контрольных и опытных животных было обнаружено большое разнообразие семенных каналцев по структуре сперматогенной ткани (рис. 34). В большинстве случаев на срезах встречались каналцы с нормальной морфологией сперматогенеза (рис. 34 г). В других областях семенников обнаруживались каналцы с самыми разнообразными нарушениями. Это – дезорганизация и отслоения сперматогенного эпителия, слущивания половых клеток в просвет каналца, межклеточные пространства (рис. 34 д, е). Однако все эти отклонения с одинаковой частотой наблюдались как у опытных, так и у контрольных животных.

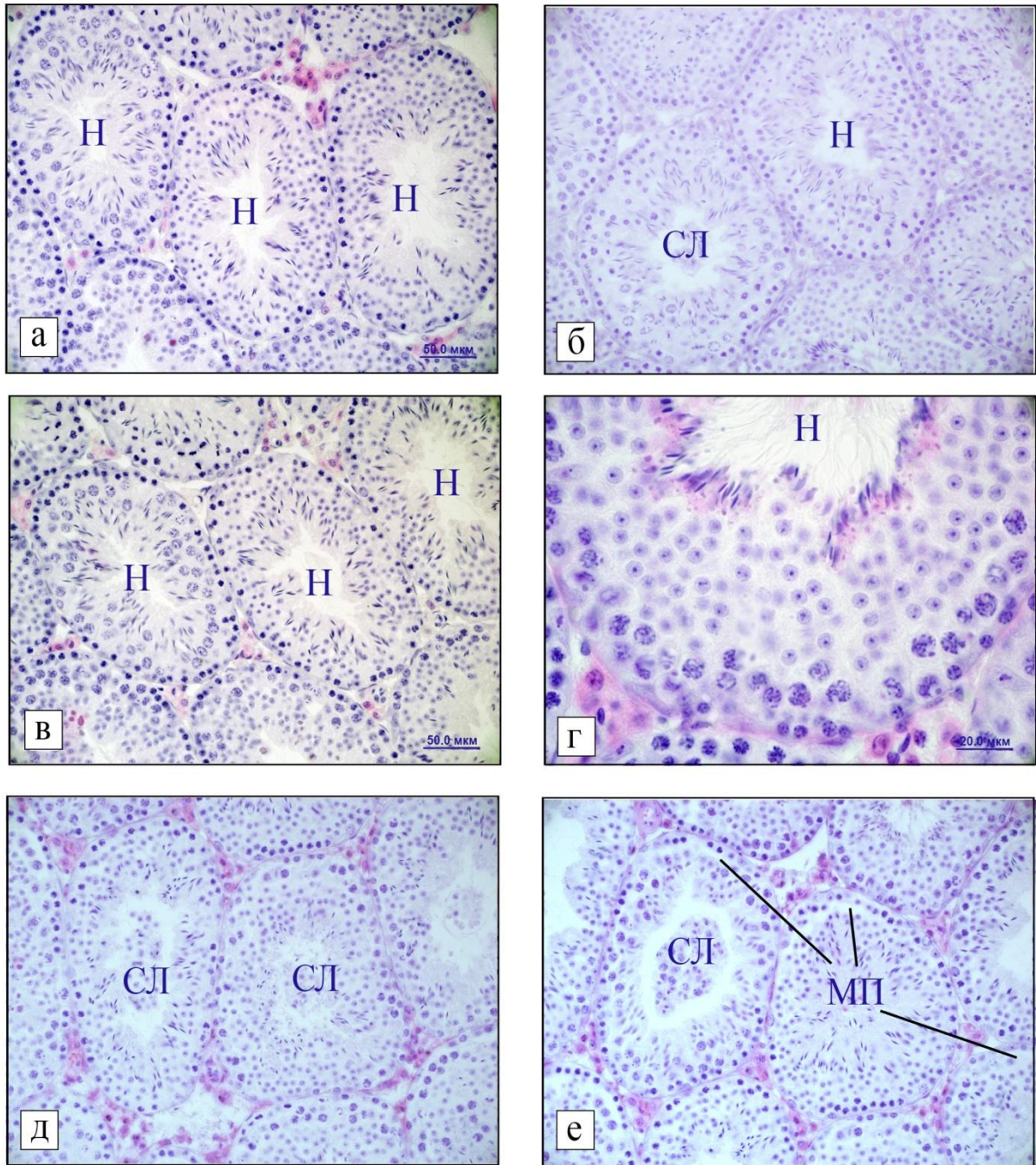


Рис.33. Срезы семенников контрольных (а,б) и подопытных мышей (в-е) на 14 сут после многократного внутрибрюшинного введения наночастиц золота ($C=1 \times 10^{15}$ частиц/мл).

Обозначения: МП – межклеточные пространства,
 Н – каналец с нормальным течением сперматогенеза,
 СЛ - слущивания.

Окраска: гематоксилин-эозин.

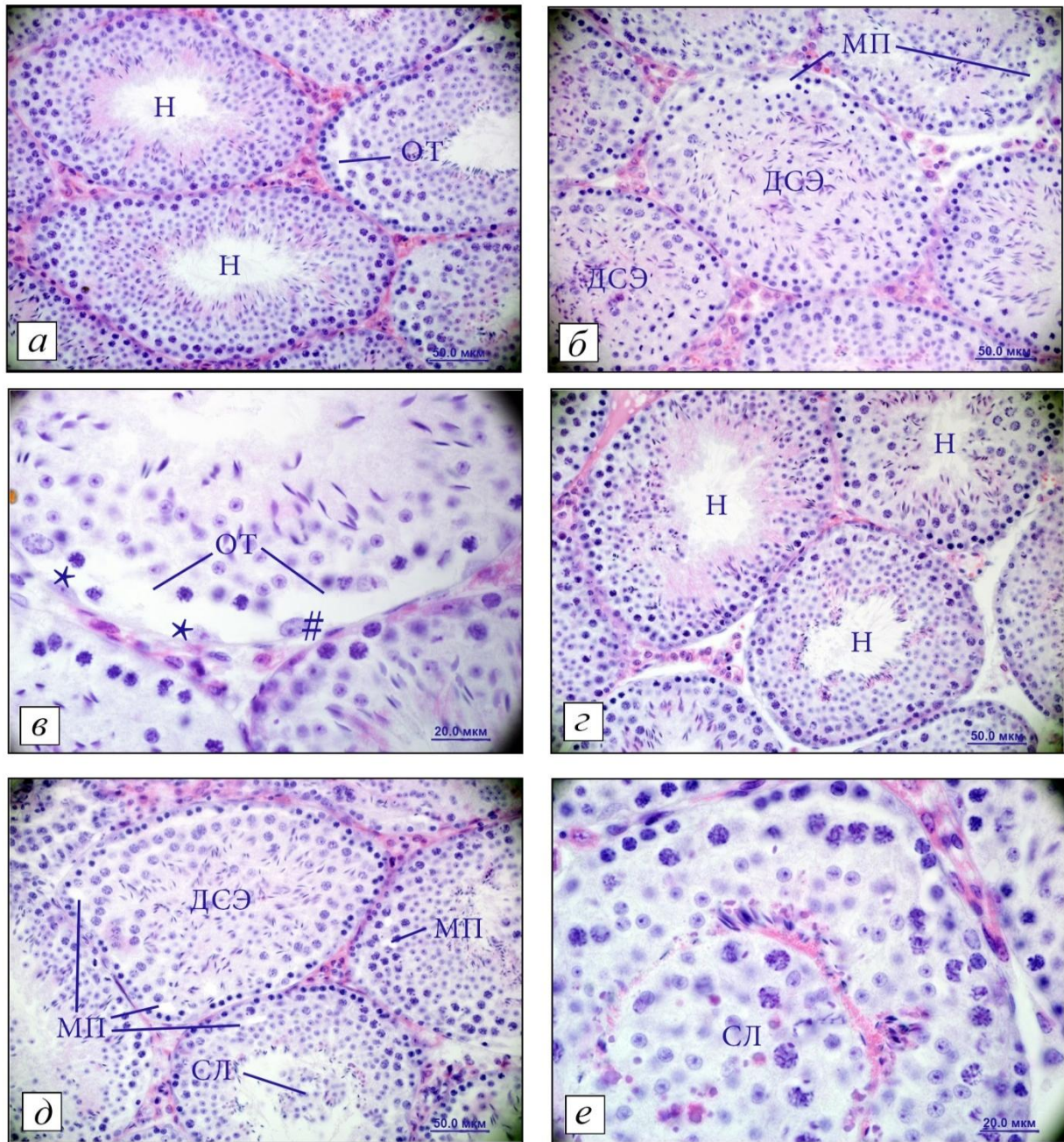


Рис.34. Срезы семенников контрольных (а-в) и подопытных мышей (г-е) на 56 сут после многократного внутрибрюшинного введения наночастиц золота ($C=1 \times 10^{15}$ частиц/мл).

Обозначения: ДСЭ - дезорганизация сперматогенного эпителия, МП - межклеточные пространства, Н - каналец с нормальным сперматогенезом, ОТ - отслоение сперматогенного эпителия от базальной мембраны, СЛ - слущивание сперматогенного эпителия в просвет канальца, * - ядра КС, # - ядро сперматогиальной клетки.

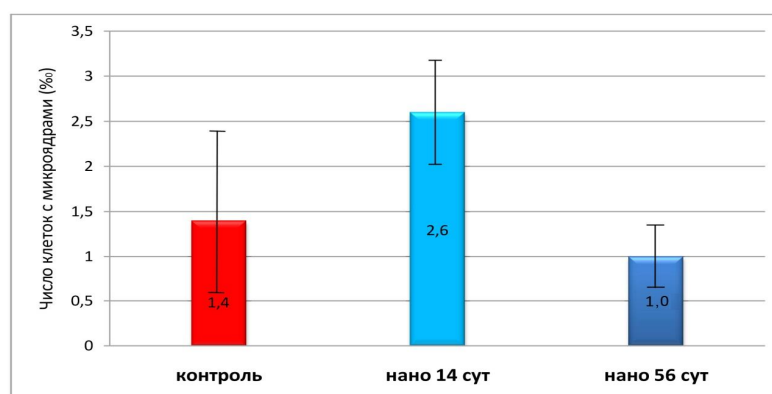
Окраска: гематоксилин-эозин.

III.4.2. Цитогенетический анализ сперматогенеза

Результаты подсчетов частоты встречаемости генетически аномальных сперматогенных клеток в семенниках контрольных и подопытных мышей приведены на рис. 35. Видно, что число сперматогониев с микроядрами у подопытных животных на 14 сут фиксации увеличивается (рис. 35 а), а к концу эксперимента вновь снижается до контрольного уровня. Однако это увеличение не является статистически достоверным при уровне значимости $p \leq 0,05$.

Что касается частоты встречаемости округлых сперматид со следами хромосомных поломок (рис. 35 б), то в опыте на 14 сут эта частота увеличивалась по сравнению с контролем в 3 раза (различия статистически достоверны), но к 56 сут вновь уменьшалась.

А) Сперматогонии



Б) Округлые сперматиды

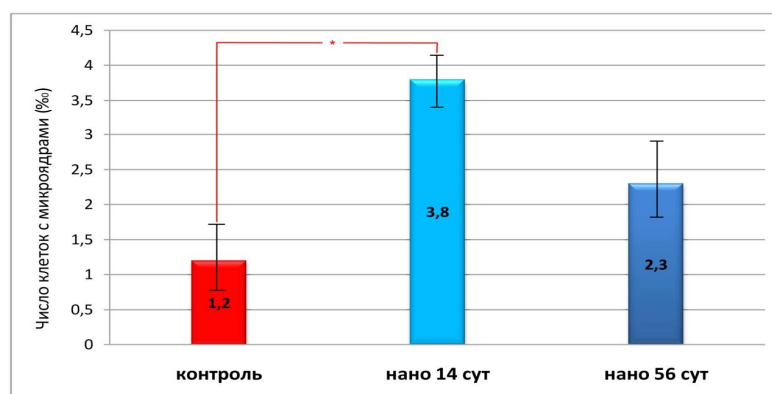


Рис.35. Динамика изменения частоты встречаемости сперматогенных клеток с микроядрами у контрольных и подопытных мышей (в %).

Примечание: * - различия по сравнению с контролем статистически достоверны при $p \leq 0,05$.

Тест на АФС показал (табл. 3), что у подопытных мышей на 14 сут фиксации в популяции тестикулярных спермиев число морфологически аномальных форм достоверно уменьшалось по сравнению с контролем, хотя в дальнейшем (56 сут) число атипичных спермиев возвращалось к уровню, наблюдаемому у контрольных животных.

Таблица.3. Частота встречаемости тестикулярных спермиев с аномальными формами головок у мышей контрольной и опытной групп (в%).

Сроки фиксации (сут)		Число жив.	АФС, $\bar{X} \pm m_x$
Контроль		4	1,9±0,4
Опыт	14	4	0,6±0,2*
	56	4	2,2±0,9

*Примечание: * - различия по сравнению с контролем статистически достоверны при $p \leq 0,05$.*

Итак, при анализе данных, полученных после многократного внутрибрюшинного введения мышам наночастиц золота ($C=1 \times 10^{15}$ частиц/мл), морфогистологических изменений в структуре сперматогенного эпителия выявлено не было, в том числе и в организации ядер нишеобразующих КС, оцениваемой по количеству гетерохроматиновых глыбок. Лишь в одном случае на 14 день после начала эксперимента при цитогенетическом изучении мы выявили достоверное увеличение частоты встречаемости aberrантных округлых сперматид. Если исходить из кинетики сперматогенеза у мышей, это связано с тем, что изучаемая при этом сроке фиксации популяция ранних

постмейотических клеток в момент воздействия наночастиц золота находилась на стадии прелептотены-лептотены I мейоза, то есть на стадии активного синтеза ДНК (Dadoune, 1995). Хорошо известно, что эта стадия развития мейотических клеток бывает очень чувствительной к радиационным и химическим воздействиям. Что касается снижения числа спермиев с морфологически аномальными головками на 14 сут фиксации, то это снижение, возможно, обусловлено элиминацией aberrантных клеток, которые в момент воздействия находились в основном на стадии округлых сперматид. В то же время цитофотометрический анализ не выявил различий по содержанию ДНК в спермиях на протяжении всего эксперимента.

Вообще, надо сказать, что литературные данные, касающиеся влияния наночастиц на сперматогенез у млекопитающих, представлены в единичном числе и носят отрывочный характер. Так, Йошида и др. (Yoshida et al., 2008), в частности, показали, что наночастицы углерода могут оказывать вредное воздействие на мужскую репродуктивную систему мышей. В семенниках у этих животных они наблюдали вакуолизацию семенных канальцев, уменьшение ежедневной продукции спермиев, а также нарушение функции клеток Лейдига, что приводило к изменениям продукции тестостерона. Авторы данной работы, однако, отметили, что токсические эффекты углеродных наночастиц зависят в большей степени от размера частиц, чем от их числа. Практически такой же характер нарушений сперматогенеза был отмечен в гонадах у половозрелых 5- 10- и 15-недельных мышей, подвергшихся воздействию углеродных наночастиц во время эмбрионального развития (Yoshida et al., 2010). В аналогичных экспериментах с воздействием наночастиц оксида титана (TiO_2) или оксида железа (Fe_3O_4) на беременных самок мышей у мужского потомства после достижения им половозрелого возраста наблюдались сильные деструктивные изменения в строении семенных канальцев, резкое уменьшение числа сперматогониев, первичных сперматоцитов, сперматид и спермиев (Takeda et al., 2009; Noori et al., 2011). Брайдич-Столле и др. (Braydich-Stolle et al., 2005, 2010) изучали токсические эффекты наночастиц серебра, оксида молибдена (MoO_3) и

алюминия в культурах ССК, выделенных из семенников 6-суточных мышат. Показано, что наночастицы MoO_3 не проявляли цитотоксического действия, тогда как наночастицы Ag в низких концентрациях нарушали пролиферативную активность стволовых сперматогониев и уже через 48 ч после добавления в среду вызывали разрушение этих клеток, причем как по механизму некроза, так и по механизму апоптоза; наночастицы Al не индуцировали сильных морфологических нарушений, но зато активно накапливались в цитоплазме клеток, образуя агрегаты, которые были не способны проникать в ядра. Тяжелые гистопатологические нарушения семенников, снижение числа спермиев и падение активности лактатдегидрогеназы-С4 были замечены у крыс в ответ на действие наночастиц оксида кремния (SiO_2) (Fan et al., 2006). Показано также (Ema et al., 2010), что наночастицы серебра, алюминия и молибдена вызывали нарушения в популяции сперматогониальных стволовых клетках.

Согласно ряду обзорных работ (Doak et al., 2009; Landsiedel et al., 2009; Ng et al., 2010), генотоксичность наночастиц и других наноматериалов активно изучается с помощью различных стандартных тест-систем и методов. Среди них большой популярностью в последнее время пользуются микроядерные тесты, которые уже давно введены в практику экспериментального мутагенеза и генетической токсикологии для выявления физических и химических агентов, обладающих кластогенной и/или анеугенной активностью. В рамках генетической нанотоксикологии методы регистрации микроядерных aberrаций в соматических клетках дали положительные результаты в 12 из 14 изученных случаев. Однако в литературе мало данных относительно генотоксичности непосредственно наночастиц золота. В одной из упомянутых выше работ (Ng et al., 2010) на примере культур фибробластов, выделенных из легких человека, была продемонстрирована способность наночастиц Au индуцировать повреждения в молекуле ДНК в форме одностранных разрывов. На другой, специфической модельной системе – смеси плазмидной ДНК и наночастиц Au – было обнаружено (Zheng et al., 2008), что после облучения быстрыми электронами число одно- и двустранных разрывов увеличивалось более чем в 2.5 раза по

сравнению с образцами «чистой» ДНК, которые подверглись такому же облучению. На модели частиц холестерической жидкокристаллической дисперсии двухцепочечной молекулы ДНК, отражающих некоторые физико-химические свойства хромосом простейших было показано (Скуридин и др., 2011), что наночастицы золота «в возрасте» 2.5 мес и размером примерно 2 нм способны быстро внедряться в бороздки двухцепочечной молекулы ДНК, формировать кластеры средней длиной 15-20 нм, и тем нарушать пространственную организацию ДНК. Индуцируемые наночастицами Au нарушения взаимной ориентации соседних пар оснований в структуре отдельных фрагментов молекулы ДНК или соседних фрагментов единой молекулы ДНК, упакованных в «теле» хромосомы, позволили авторам предположить, что наночастицы золота обладают потенциальной генотоксической активностью.

Ш.5. Изучение процесса деконденсации хроматина в зрелых сперматозоидах мышей после однократного и многократного воздействия наночастиц золота на спермиогенные (постмейотические) клетки

Динамика деконденсации ядерного материала в эпидидимальных сперматозоидах мышей на 14 сут после однократного внутрибрюшинного введения наночастиц золота ($C=1 \times 10^{15}$ частиц/мл) представлена на рис. 36 (а,б). Видно, что в опыте уже через 20 минут после обработки ДТТ интактные ядра фактически полностью отсутствовали, а число частично и полностью деконденсированных ядер составило, соответственно, 31,5% и 68,5%, в то время как в контрольных образцах были обнаружены все три основных типа гамет: интактные - 19,7%, частично деконденсированные - 69,4% и полностью деконденсированные - 10,8%. Через 40 минут после тиоловой обработки число "озолоченных" спермиев с полностью деконденсированными ядрами составило 100%, при этом в контроле продолжали сохраняться все три типа гамет:

соответственно, 13,5% с интактными, 42% с частично деконденсированными, 44,5% с полностью деконденсированными ядрами.

Принципиально другая картина по динамике деконденсации ядерного материала в эпидидимальных спермиях у мышей наблюдалась на 14 день после многократного введения мышам суспензии наночастиц золота (рис. 36 в, г). Можно видеть, что после 20- или 40-минутной обработки клеточной суспензии в растворе ДТТ процент гамет с интактными ядрами был очень высоким. В то же время число спермиев с полностью деконденсированным хроматином составило, соответственно, 25.7 и 31.8% против 68.5 и 100% в опыте с однократным введением наночастиц.

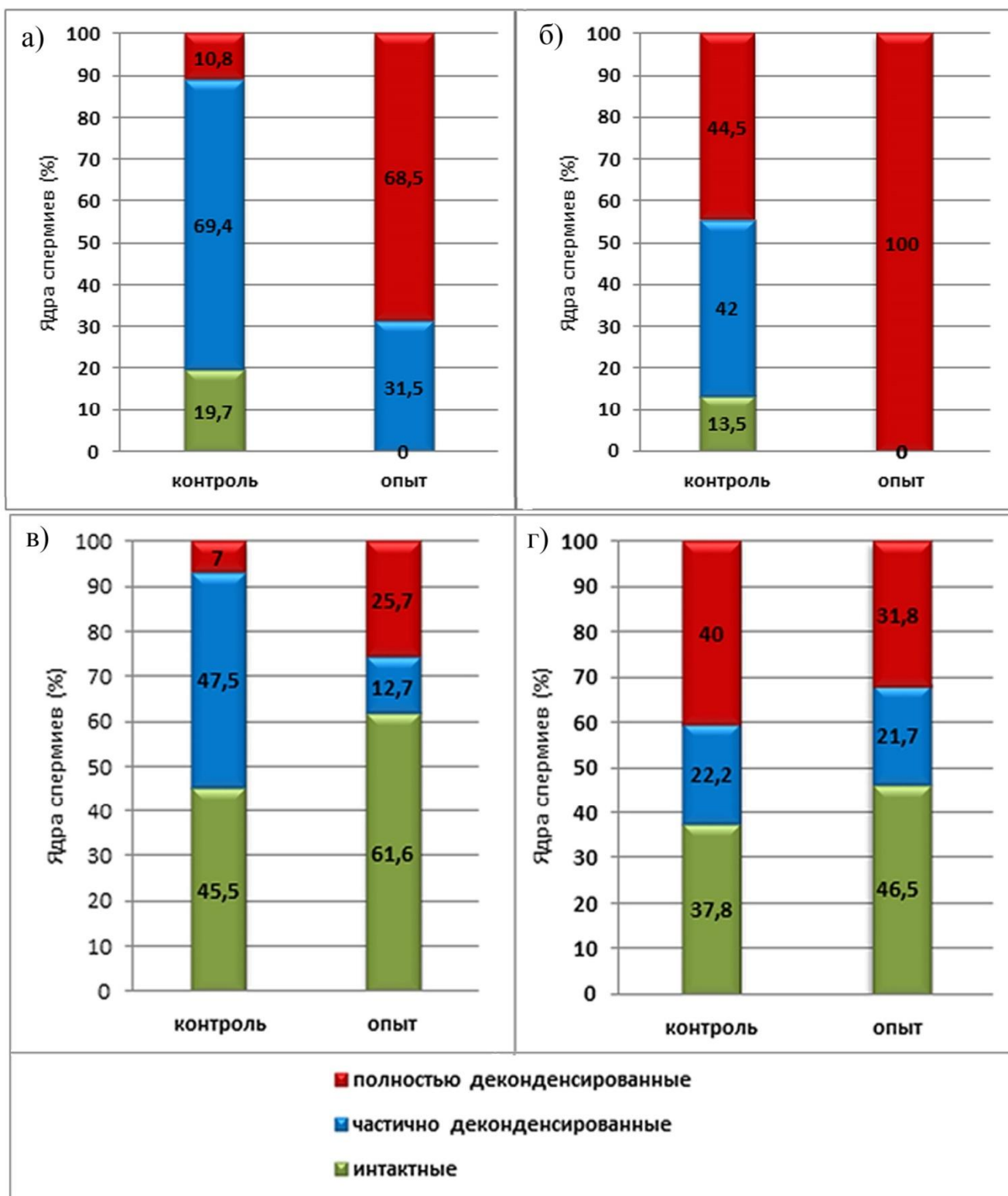


Рис.36. Частота встречаемости недеконденсированных («интактных»), частично и полностью деконденсированных ядер в эпидидимальных спермиях мышей на 14 сут после однократного (а, б) и многократного (в, г) внутрибрюшного введения наночастиц золота ($C=1 \times 10^{15}$ частиц/мл). а, в – через 20 мин инкубации в ДТТ, б, г – через 40 мин инкубации в ДТТ.

С большой уверенностью можно заключить, что обнаруженный в опыте с однократным воздействием наночастиц золота на мышей факт ускоренной и тотальной деконденсации ядерного хроматина в эпидидимальных сперматозоидах связан с дефектами в организации гаметического ДНП-комплекса, его так называемой «незрелостью». Кинетика сперматогенного процесса у мышей такова, что значительная часть эпидидимальных спермиев, анализируемых на 14-е сут эксперимента, в момент воздействия наночастиц Au находилась на промежуточных стадиях спермиогенеза, т.е. на стадиях активного синтеза и накопления спермиоспецифических протаминоподобных белков, в норме замещающих гистоны соматического и мейотического типов (D’Occhio *et al.*, 2007). Вновь синтезируемые спермиоспецифические белки, богатые аргинином и цистеином, участвуют в уникальных и сложных процессах конденсации и стабилизации хроматина мужских гамет (Oliva, 2006; Vjorndahl, Kvist, 2010). Они инактивируют транскрипционную активность ДНК и формируют в ядрах за счет образования межмолекулярных дисульфидных связей жесткую нуклеопротеиновую структуру, практически недоступную действию многих повреждающих факторов окружающей среды, чем гарантируют безопасность доставки сперматозоидом отцовского генома к точкам оплодотворения. Существенно, что процессы компактизации и стабилизации хроматина, идущие за счет образования в нем огромного числа S–S-связей после окисления сульфгидрильных групп, продолжаются и во время движения сперматозоидов по эпидидимису.

Ранее с помощью просвечивающей электронной микроскопии и метода ДНК-комет, позволяющего обнаруживать тонкие повреждения в геноме, было показано (Cho *et al.*, 2003; Carrell *et al.*, 2007), что нарушения количественного состав белковых фракций PRM1 (протамин-1) и PRM2 (протамин-2) в мышинных сперматозоидах приводят к изменениям в организации и целостности ДНК гамет. В результате этих нарушений хроматин сформировавшихся спермиев приобретает менее компактную и более чувствительную к химическим воздействиям структуру по сравнению с хроматином нормальных гамет. Применение метода

ICSI (микроинъекция сперматозоида внутрь яйцеклетки), в свою очередь, позволило установить (Cho *et al.*, 2003, Suganuma *et al.*, 2005), что в большинстве случаев такие сперматозоиды неспособны поддерживать нормальный эмбриогенез. Согласно наблюдениям Гринье и др. (Grenier *et al.*, 2010), хроническое повреждающее воздействие малыми дозами противоопухолевого агента циклофосфида на постмейотические клетки крыс ускоряло процесс деконденсации ядер и существенно изменяло характер трансформации хроматина зрелых сперматозоидов во время образования мужского пронуклеуса в зиготе.

Что касается результатов проведенного нами исследования с многократным воздействием наночастиц золота на постмейотические (спермиогенные) клетки в гонадах мышей, то логично было ожидать результата, схожего с тем, который был получен при их однократном воздействии. Однако вопреки ожиданиям мы столкнулись с парадоксальной, трудно объяснимой ситуацией, когда в ответ на действие тиолового реагента сравнительно большое число эпидидимальных сперматозоидов проявило устойчивость, не уступающую устойчивости зрелых гамет, не испытавших в спермиогенезе действия наночастиц Au.

Пока этот факт трудно объяснить с чем это связано. Очень может быть, что такое «выравнивание» частот связано с возможностью перехода небольшой части интактных, озолоченных ядер в состояние частично и полностью деконденсированных после более длительной обработки в растворе, содержащем ДТТ. Скорее всего, это связано с тем, что суммарное, кумулятивное действие наночастиц золота приводит к существенным изменениям биохимической среды в семенниках и эпидидимисах мышей. Эти изменения, в свою очередь, вероятно, влекут за собой активацию процессов окисления свободных тиольных (SH) групп, в норме связанных цинком, и, как следствие, формирование дополнительных дисульфидных связей в хроматине сперматозоидов во время созревания и транспорта последних. Можно полагать, что именно такой специфический «компенсаторный» (адаптивный) механизм, направленный на «сглаживание» тех нарушений, которые могли возникнуть во время смены типа основных ядерных белков в дифференцирующихся спермиогенных клетках под влиянием

многократного воздействия наночастиц золота, лежит в основе «нормализации» зрелых спермиев в их реакции на действие ДТТ. Насколько состоятельна такая трактовка столь парадоксального дифференцированного эффекта наночастиц золота, должны показать дальнейшие, более обстоятельные исследования.

III.6. Эффект наночастиц золота на процесс деконденсации ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах в условиях *in vitro*

Видно, что в опыте после воздействия наночастиц золота морфологический процесс распаковки хроматина кардинально отличался от контроля (рис. 37); площадь частично и полностью деконденсированных ядер составляла в среднем, соответственно, 60 и 75 μm^2 против 85 μm^2 и 330 μm^2 в спермиях, не испытавших эффекта наночастиц золота.

Результаты подсчетов частоты встречаемости половых клеток с разной степенью деконденсации ядерного материала суммированы на рис. 38. В контроле после 20-минутной обработки в растворе ДТТ подавляющее число спермиев имело частично деконденсированные ядра (94.5%), тогда как после инкубации в тиоловом реагенте в течение 40 мин преобладали в основном спермии уже с полностью деконденсированными ядрами (80.5%). В образцах, предварительно инкубированных в среде с наночастицами золота в концентрации 1×10^{15} ч/мл в течение 20 мин с последующей обработкой в растворе ДТТ в течение 20 и 40 мин, доминировали спермии, соответственно, с интактными (90%) и частично деконденсированными ядрами (80%).

При обработке спермиев наночастицами золота в концентрации 0.5×10^{15} ч/мл и ДТТ в течение 20 мин превалировали интактные ядра (90%). При воздействии этого реагента на «озолоченные» спермии в течение 40 мин число клеток с полностью деконденсированными ядрами по сравнению с контролем оказалось меньше в 4,4 раза.

После 40-минутной инкубации спермиев в среде, содержащей наночастицы золота в концентрации 1×10^{15} ч/мл, и последующей обработки ДТТ в течение 20 или 40 мин на препаратах обнаруживались преимущественно интактные ядра.

В то же время при действии наночастиц золота в концентрации 0.5×10^{15} и последующей обработки ДТТ в течение 20 мин число интактных ядер оставалось максимальным (80%), но через 40 мин после обработки тиоловым реагентом существенно возросло число частично деконденсированных ядер (67%).

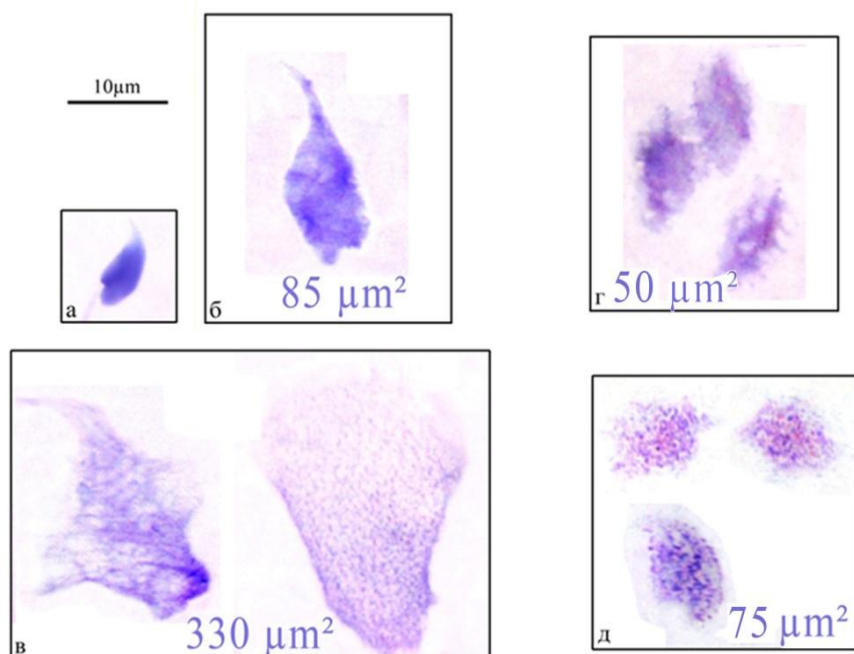


Рис. 37. Недеконденсированные (а), частично (б, г) и полностью (в, д) ядра эпидидимальных спермиев мышей. а, б, в – контроль; г, д – опыт.

Окраска: толуидиновый синий.

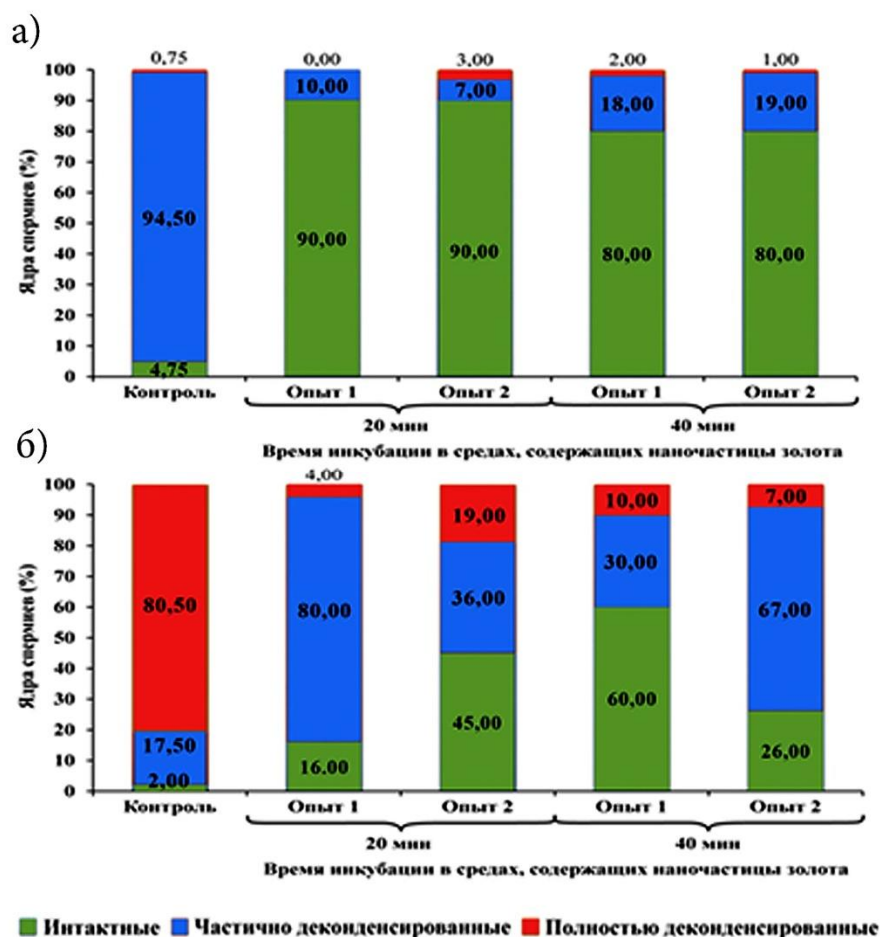


Рис. 38. Соотношение числа сперматозоидов с разной степенью деконденсации хроматина в контроле и опыте после 20 мин (а) и 40 мин (б) инкубации в DTT.

Таким образом, в подавляющей части эпидидимальных спермиев мышей наночастицы золота нарушают процесс деконденсации ядерного хроматина, являющегося одним из главных условий образования мужского пронуклеуса и дальнейшего развития зигот и эмбрионов. Механизм, столь необычного цитотоксического действия наночастиц золота, связан, по-видимому, с взаимодействием этих частиц с молекулами двухцепочечной ДНК в составе хроматина. В пользу этого утверждения свидетельствует тот факт, что наночастицы золота именно указанного размера могут располагаться в широкой бороздке молекул ДНК. Это сопровождается возмущением структуры жидких кристаллов ДНК, моделирующих состояние генетического материала в составе некоторых биологических систем (Евдокимов и др., 2010).

В этом контексте уместно упомянуть работу, в которой было установлено (Hernandez-Ochoa et al., 2006), что, например, микрочастицы свинца, преодолевая гемато-эпидидимальный барьер, обнаруживали высокое сродство с сульфгидрильными группами в спермиоспецифических протаминаподобных белках. Эти белки в норме играют важную роль в конденсации и стабилизации хроматина гамет на поздних стадиях созревания. Накопление микрочастиц свинца в ядрах спермиев мышей, их связывание с тиоловыми группами приводило к суперстабилизации ДНП-комплекса, что влекло за собой торможение или даже полное угнетение процесса ядерной деконденсации после комбинированной обработки гамет в растворах НДС/ДТТ. И, наконец, полученные нами результаты хорошо согласуются с наблюдениями, показавшими способность разноразмерных наночастиц золота проникать в жгутики и ядра эякулированных сперматозоидов человека и млекопитающих животных и тем нарушать их структуру и двигательную активность (Wiwanitkit et al., 2009; Moretti et al., 2012, Taylor et al., 2014, Tiedemann et al., 2014). В качестве одного из возможных механизмов рассматривается образование в спермиях большого числа активных форм кислорода. Другое объяснение – прямое взаимодействие наночастиц золота со свободными сульфгидрильными группами, располагающимися на поверхности зрелых мужских гамет (Taylor et al., 2014).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в настоящей работе данные с большой очевидностью показали, что однократная интратестикулярная инъекция мышам химического мутагена дипина (опыт) или физиологического раствора (контроль) вызывает существенные деструктивные изменения в организации сперматогенного эпителия, носящие обратимый характер. Правда, в мутагенизированных семенниках животных их проявление было более выражено, о чем свидетельствуют не только сравнительно более позднее восстановление сперматогенной структуры, но и практически полное отсутствие на 35-е сут фиксации зрелых гамет в каудальном отделе эпидидимиса и одновременное появление в семенниках огромного числа спермиев с аномальной формой головок. Если судить по результатам оценки частоты встречаемости сперматогониальных и мейотических микроядер на отдаленных сроках последствия, становится очевидным, что по цитогенетическим эффектам на ССК дипин и физиологический раствор не уступали друг другу. С другой стороны, тот факт, что как в контроле, так и в опыте, в популяции округлых сперматид частота встречаемости клеток с хромосомными поломками была весьма высокой и примерно одинаковой, скорее всего можно объяснить нарушениями ферментных систем репарации, в норме действующих в профазе мейоза. Эти нарушения, как можно предполагать, могут вызывать усиление спонтанного мутагенеза. Особого внимания заслуживает тот факт, что главный повреждающий эффект интратестикулярных инъекций дипина или физиологического раствора на сперматогенез мышей проявился в наибольшей степени при тиолиндуцированной деконденсации ядерного хроматина зрелых эпидидимальных спермиев *in vitro*. Эти наши наблюдения подтверждают известную точку зрения о том (Qui et al., 1995), что количественная оценка химически индуцированных изменений в характере разбухания и декомпактизации ядер зрелых спермиев, может стать весьма полезным

инструментом в понимании последствий влияния репродуктивных токсикантов на сперматогенную функцию.

С помощью методов интерфазной цитогенетики были проанализированы культуры КС половозрелых мышей. Показано, что с 3 сут культивирования число хромосом и ядрышек резко увеличивается. Аналогичная реорганизация ядерного материала в КС ранее была отмечена в одной из работ польских исследователей (Krzanowska, Bilińska, 2000). Впервые нами также показано, что в условиях *in vitro* популяция КС разделяется на два «типа», различающихся по морфологии и пролиферативной стратегии. Установленный факт существенной реорганизации ядер у части КС, уже начиная с 3 сут культивирования, может быть объяснением феномена снижения числа Wt1+ клеток на ранних сроках культивирования. Биология КС изучена недостаточно, и появление в культуре двух «типов» КС вполне может быть отражением существующей гетерогенности популяции этих клеток.

Выполненные в работе трансплантационные эксперименты воспроизвели результаты, полученные другими исследователями: развитие сперматогенеза после трансплантации фрагментов сперматогенной ткани или суспензии клеток семенника от новорожденных животных (Schlatt et al., 2003) и остановку развития после трансплантации сперматогенного эпителия от взрослых самцов (Kim et al., 2007). Поведение же сперматогенного эпителия в эктопических условиях после введения химического мутагена дипина мышам-донорам описано впервые. В этом случае наблюдалось сохранение целостности семенных канальцев и КС в них. Обнаружена возможность образования канальцеподобных структур при помещении под капсулу почки КС, культивированных в условиях, стимулирующих их к пролиферации. Ранее образование структур подобного рода было выявлено при трансплантации под почечную капсулу изолированных клеток семенника или выращенных в культуре, но от новорожденных животных (Dufour et al., 2002; Gassei et al., 2006). Таким образом, полученные результаты подтверждают справедливость

гипотезы о стимуляции КС к делению как обязательном условии реализации их регенеративного потенциала.

Показано, что многократное введение животным наночастиц Au размером ~2.5 нм в целом не нарушало структурную организацию сперматогенного эпителия и не оказывало выраженного мутагенного эффекта на сперматогониальные стволовые клетки. Однако наночастицы золота индуцировали слабые обратимые хромосомные мутации в ранних сперматоцитах I порядка, о чем свидетельствуют результаты подсчета частоты встречаемости округлых сперматид с микроядрами на 14 сут последствия.

С помощью метода деконденсации гаметического хроматина *in vitro*, установлено, что в опыте с многократным воздействием наночастиц золота на постмейотические клетки мышей большое число ядер эпидидимальных спермиев (14 сут фиксации) проявило устойчивость к действию деконденсирующего агента ДТТ. Эта устойчивость фактически не уступала устойчивости нормальных зрелых гамет, не испытывавших на себе в спермиогенезе действия наночастиц Au, о чем судили по частоте встречаемости недеконденсированных (интактных) ядер в контроле. Напротив, в опыте с однократным воздействием наночастиц золота на спермиогенные (постмейотические) клетки и при том же сроке фиксации материала процесс индуцированной декомпактизации хроматина в эпидидимальных спермиях шел в ускоренном темпе, и число гамет с полностью деконденсированными ядрами достигало 100% против 44% в контроле. В то же время использование модельной системы деконденсации гаметического хроматина *in vitro* показало, что инкубация зрелых эпидидимальных сперматозоидов мышей в золе наночастиц золота приводила к нарушениям динамики процесса декомпактизации хроматина и структуры ядер. Резюмируя скажем, что фактических данных, касающихся влияния наночастиц золота на половые клетки, еще очень мало, они неоднозначны и, конечно, не позволяют полностью оценить репродуктивные риски, возникающие при использовании этих, весьма перспективных с практической точки зрения наноструктур.

Однако и уже имеющиеся результаты позволяют говорить о возможном сильном влиянии наночастиц золота на мужские половые клетки.

ВЫВОДЫ

1. У мышей после интратестикулярного введения химического мутагена дипина (опыт) или физиологического раствора (контроль) динамика количественных, морфогистологических, цитогенетических изменений клеток сперматогенного эпителия, а также изменений в организации гаметического ДНП-комплекса, в целом имела сходную тенденцию. Однако в отличие от контроля в мутагенизированных семенниках эти нарушения носили более выраженный характер.

2. В процессе культивирования КС разделяются на два типа клеток, различающихся по структурной организации ядер и пролиферативной стратегии. Часть КС проявляют себя как полиплоидизирующаяся клеточная популяция.

3. Активация КС к делениям является условием необходимым для развития сперматогенного процесса при трансплантации под капсулу почки.

4. Многократные введения мышам наночастиц золота не нарушали структуру сперматогенного эпителия и не оказывали четкого, сильно выраженного мутагенного влияния на наследственные структуры ССК; сравнительно высокую чувствительность к цитогенетическому эффекту наночастиц Au проявили ранние сперматоциты I порядка.

5. В опыте с однократным воздействием наночастиц золота на спермиогенные (постмейотические) клетки процесс индуцированной декомпактизации хроматина в ядрах эпидидимальных спермиев шел в ускоренном темпе, и число гамет с полностью деконденсированными ядрами достигало 100%, в то время как в опыте с многократным воздействием этих частиц выход таких клеток составил 32%.

6. Наночастицы золота нарушают процесс деконденсации ядерного хроматина в зрелых сперматозоидах мышей в условиях *in vitro*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГС – аномальные головки спермиев

АФГС – аномальные формы головок спермиев

ДТТ – дитиотреитол

КС – клетки Сертоли

ПАФ – параформальдегид

ССК – сперматогониальные стволовые клетки

BrdU –бромдезоксимуридин (bromodeoxyuridine)

DAPI – 4,6-диамидино-2-фенилиндол (4',6-diamidino-2-phenylindole)

EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота (ethylenediaminetetraacetic acid)

MEM – среда Игла в модификации (modified Eagle's medium)

SAM – senescence-accelerated mouse, ускоренно стареющие мыши

НДС – натрия додецилсульфат

Sox-9 – SRY (sex determining region Y)-box 9

VI. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Агроскин Л.С., Бродский В.Я., Бабаян Г.В. Стандарт в цитофотометрии // Цитология.–1976.–Т.18.–С.512–521.
2. Андреева Л.Е., Серова И.А. Влияние микроманипуляционной техники, применяемой для трансгенеза, на развитие мышечной ткани // Онтогенез.–1992.–Т.23.–С.637–642.
3. Брагина Е.Е., Сухих Г.Т., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Куш А.А., Климова Р.Р., Альховский С.В., Гаврилов Ю.А., Науменко В.А. Влияние вируса простого герпеса на сперматогенез мышечной ткани при экспериментальной инфекции органной культуры фрагмента семенника // Андрология и генитальная хирургия.–2009.–№4.–С.44–49.
4. Габаева Н.С. О строении и функциях фолликулярного эпителия семенников позвоночных // в кн. Современные проблемы сперматогенеза.–М.–Наука.–1982.–С.108–159.
5. Гордеева О.Ф., Захидов С.Г., Маршак Т.Л. Биологическая модель ускоренного старения. II. Возраст зависимые изменения числа развивающихся мужских половых клеток и клеток Сертоли в гонадах мышечной линии SAM (senescence-accelerated mouse) // Изв. РАН. Сер. Биол.–2001.–№3.–С.276–283.
6. Данилова Л.В. Ультраструктурное исследование сперматогенеза.–М.–Наука.–1978.–С.206.
7. Домарацкая Е.И., Буеверова Э.И., Паюшина О.Д., Старостин В.И. Повреждение алкилирующим препаратом дипином кроветворных и стромальных клеток костного мозга // Изв. РАН. Сер. Биол.–2005.–№3.–С.267–272.
8. Евдокимов Ю.М. Несколько замечаний по поводу нанотехнологий // Экономические стратегии.–2008.–№7.–С.56–61.
9. Евдокимов Ю.М., Салаянов В.И., Скуридин С.Г. Наноструктуры и наноконструкции на основе ДНК // Изд-во «Сайнс пресс».– М.–2010.–256с.

10. Захидов С.Т. Процессы нормального и атипичного сперматогенеза у животных // Автореф. Дис. Докт. Биол. Наук. – М. – МГУ. – 1993. – 41с.
11. Захидов С.Т. Современные достижения в исследованиях проблемы сперматогенеза // в кн. Проблемы репродуктивной биологии в трудах профессора С.И. Кулаева и его последователей. – М. – МГУ. – 1998. – С.234–259.
12. Захидов С.Т., Борончук Г.В., Наук В.А., Бродский В.Я. Количественные изменения гистонов при образовании в сперматозоидах млекопитающих *in vitro* структур, свойственных мужскому пронуклеусу // Онтогенез. – 1985. – Т.16. – С.73–75.
13. Захидов С.Т., Кулибин А.Ю., Малолина Е.А., Маршак Т.Л. Стволовые клетки сперматогониального компартмента // Молекулярная медицина. – 2009а. – № 4. – С.37–44.
14. Захидов С.Т., Кулибин А.Ю., Маршак Т.Л. Стволовые клетки и клетки ниши сперматогенной системы // в кн. Биология стволовых клеток и клеточные технологии. Москва. – «Медицина» и «Шико». – 2009б. – С.311–380.
15. Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Голиченков В.А. Возможность перехода высокодифференцированных клеток Сертоли к пролиферации после действия химических мутагенов // Док. РАН. – 1995. – Т.344. – №5. – С.692–694.
16. Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Хода Х.А. Махран, Голиченков В.А. Влияние химических мутагенов на свойства хроматина сперматогенных клеток мышей // Изв. РАН. Сер. Биол. – 1994а. – №5. – С.725–731.
17. Захидов С.Т., Паранюшкина Л.П., Хода Х.А. Махран. Влияние химических мутагенов на сперматогенез млекопитающих. Количественная оценка // Изв. РАН. Сер. Биол. – 1994в. – №6. – С.870–879.
18. Захидов С.Т., Паранюшкина Л.П., Хода Х.А. Махран. Влияние химических мутагенов на сперматогенез млекопитающих. Цитогенетический анализ // Изв. РАН. Сер. Биол. – 1994б. – №3. – С.353–362.

19. Захидов С.Т. Нанотехнологии и генетическая безопасность // Нанотехнологии и охрана здоровья.–2010а–Т.II.–№1(2).–С.12–16.
20. Захидов С.Т. Мутационная генетика в системе нанотехнологий // Нанотехнологии и охрана здоровья.–2010б–Т.II.–№3(4).–С.28–43.
21. Исламов Р. Токсичность наноматериалов // Электр. журнал нанотехнологического сообщества.–2009.–Режим доступа: <http://www.nanometer.ru/users/renat.html>.
22. Кулибин А.Ю. Ответ генетически нестабильной сперматогенной системы ускоренно стареющих мышей линии SAMP1 на мутагенное воздействие // Автореф. Дис. Канд. Биол. Наук.–М.–МГУ.–2006.–21с.
23. Крысанов Е.Ю., Демидова Т.Б., Пельгунова Л.А. Изменение митотического индекса у рыб Данио Рерио (*Danio Rerio*) в присутствии наночастиц диоксида церия (CeO_2) // Док. РАН.–2011.–Т.436.–№2.–С.280–282.
24. Лысцов В.Н., Мурзин Н.В. Проблемы безопасности нанотехнологий.–М.–МИФИ.–2007.–№70.–С.2–9.
25. Малолина Е.А., Кулибин А.Ю. Характеристика культуры клеток Сертоли, полученных от половозрелых мышей // XVIII Межд. науч. конф. студ., асп. и мол. ученых. Тезисы докладов.–2011.–С.12–13.
26. Маршак Т.Л., Бродский В.Я., Урываева И.В. Влияние свойств ДНП и условий проведения гидролиза на интенсивность окрашивания при реакции Фельгена // Онтогенез.–1970.–Т.1.–№4.–С.421–427.
27. Маршак Т.Л., Делоне Г.В., Урываева И.В. Особенности организации ядрышкового аппарата в диплоидных и полиплоидных ядрах новообразованных гепатоцитов при дипиновом канцерогенезе // Онтогенез.–1997.–Т.28.–№6.–С.451–457.
28. Маршак Т.Л., Дунгенова Р.Е., Седкова Н.А., Бродский В.Я. Синтез рибосомной РНК, число и тип ядрышек в гепатоцитах крысы // Цитология.–1994.–Т.36.–№3.–С.252–259.

29. Маршак Т.Л., Крылова Т.Ю., Захидов С.Т. Особенности организации ядер клеток Сертоли после действия дипина // Цитология.–2002.–Т.44.–№9.–С.890–891.
30. Махран Х. Особенности сперматогенеза у мышей после действия химического мутагена дипина // Автореф. Дис. Канд. Биол. Наук.–М.–МГУ.–1994.–С.22.
31. Морозов П.А., Ершов Б.Г., Абхалимов Е.В., Дементьева О.В., Филиппенко М.А., Рудой В.М., Ролдугин В.И. Влияние озона на плазмонное поглощение гидрозолей золота: квазиметаллические и металлические наночастицы // Коллоид. журн.–2012.–Т.74.–№ 4.–С.522–529.
32. Попова Е.А., Кривохарченко А.С., Вильянович Л.И. Развитие мышинных эмбрионов *in vitro* при различных вариантах микроинъекции // Онтогенез.–2002.–Т.33.–С.107–110.
33. Проценко Л.Д., Булкина З.П. Дипин // в кн. Химия и фармакология синтетических противоопухолевых препаратов.–Киев.–Наукова думка.–1985.–С.128–136.
34. Райцина С.С. Гематотестикулярный барьер // в кн. Современные проблемы сперматогенеза.–М.–Наука.–1982.–С.191–224.
35. Райцина С.С. Гематотестикулярный барьер и его роль в сохранении генетической информации в половых клетках // в кн. Сперматогенез и структурные основы его регуляции.–М.–Наука.–1985а.–С.20–45.
36. Райцина С.С. Деструкция семенных канальцев при действии повреждающих факторов на семенники млекопитающих // в кн. Сперматогенез и структурные основы его регуляции. М.: Наука. 1985б. С.82–104.
37. Райцина С.С. Репродуктивная стратегия при возникновении и развитии половых клеток // в кн. Сперматогенез и структурные основы его регуляции.–М.–Наука.–1985в.–С.5–19.
38. Райцина С.С. Сперматогенез, особенности дифференцировки клеток семенника и их регенерационные потенции // в кн. Сперматогенез и структурные основы его регуляции.–М.–Наука.–1985г.–С.137–168.

39. Рузен-Ранге Э. Сперматогонии и динамика сперматогенеза // в кн. Сперматогенез у животных. – М. – Мир. – 1980. – С. 169–181.
40. Скуридин С.Г., Дубинская В.А., Рудой В.М., Дементьева О.В., Захидов С.Т., Маршак Т.Л., Кузьмин В.А., Попенко В.И., Евдокимов Ю.М. Действие наночастиц золота на упаковку молекул ДНК в модельных системах // Докл. РАН. – 2010. – Т. 432. – № 6. – С. 838–841.
41. Сулейманова Л.В. Морфологические изменения в органах и тканях экспериментальных животных при воздействии наночастиц золота // Автореф. Дис. Канд. Мед. Наук. – Саратов. – ГМУ. – 2009. – С. 26.
42. Сысоева В.Ю., Онищенко Г.Е. Изменения строения аппарата Гольджи гепатоцитов мыши в клеточном цикле // Биологические мембраны. – 2003. – Т. 20. – № 4. – С. 288–300.
43. Тюленев Ю.А., Науменко В.А., Климова Р.Р., Курило Л.Ф., Шилейко Л.В., Сегал А.С., Ковалев В.А., Куш А.А. Разработка органной культуры мужских гонад для вирусологических исследований // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V. – № 4. – С. 66–69.
44. Урываева И.В., Маршак Т.Л., Делоне Г.В. Клеточные циклы в процессе переживания клеток печени после потенциально летального повреждения генома дипином // Бюлл. Экспер. Биол. – 1996. – Т. 122. – № 9. – С. 353–355.
45. Урываева И.В., Фактор В.М. Образование абберрантных полиплоидных гепатоцитов при действии алкилирующего препарата дипина и стимуляции пролиферации // Цитология. – 1982. – Т. 24. – № 8. – С. 911–918.
46. Урываева И.В., Фактор В.М., Бродский В.Я. Влияние алкилирующего агента дипина на индуцированную пролиферацию гепатоцитов. II. Увеличение периода синтеза ДНК // Цитология. – 1979. – Т. 21. – № 6. – С. 678–685.
47. Фактор В.М., Урываева И.В., Соколова А.С. Влияние алкилирующего агента дипина на индуцированную пролиферацию гепатоцитов. I. Кинетика клеточной популяции // Цитология. – 1979. – Т. 21. – № 5. – С. 541–547.

48. Ahmed E.A, van der Vaart A., Barten A., Kal H.B., Chen J., Lou Z., Minter-Dykhouse K., Bartkova J., Bartek J., de Boer P., de Rooij D.G. Differences in DNA double strand breaks repair in male germ cell types: lessons learned from a differential expression of Mdc1 and 53BP1 // DNA Repair.–2007.–V.6.–P.1243–1254.
49. Ahmed E.A.; Barten-van Rijbroek A.D., Kal H.B., Sadri-Ardekani, H., Mizrak, S.C., van Pelt A. M., de Rooij, D.G. Proliferative activity *in vitro* and DNA repair indicate that adult mouse and human Sertoli cells are not terminally differentiated, quiescent cells // Biol. Reprod.–2009.–V.80.–P.1084–1091.
50. Albanese A., Chan W.C.W. Effect of Gold Nanoparticle Aggregation on Cell Uptake and Toxicity // ACS Nano.–2011.–V.5.–№7.–P.5478–5489
51. Andersen J.S., Lam Y.W., Leung A.K.L. Nucleolar proteome dynamics // Nature.–2005.–V.433.–P.77–83.
52. Andrey P., Kiêu K., Kress C., Lehmann G., Tirichine L., Liu Z., Biot E., Adenot P.G., Hue-Beauvais C., Houba-Hérin N., Duranthon V., Devinoy E., Beaujean N., Gaudin V., Maurin Y., Debey P. Statistical analysis of 3D images detects regular spatial distributions of centromeres and chromocenters in animal and plant nuclei // PLoS Comput. Biol.–2010.–V.6(7).
53. Arregui L., Rathi R., Megee S.O., Honaramooz A., Gomendio M., Roldan E., Dobrinski I. Xenografting of sheep testis tissue and isolated cells as a model for preservation of genetic material from endangered ungulates // Reproduction.–2008a.–V.136.–P.85–93.
54. Arregui L., Rathi R., Zeng W., Honaramooz A., Gomendio M., Roldan E.R.S., Dobrinski I. Xenografting of adult mammalian testis tissue // Anim. Reprod. Sci.–2008b.–V.106.–P.65–76.
55. Arregui L, Dobrinski I. Xenografting of testicular tissue pieces: 12 years of an *in vivo* spermatogenesis system // Reproduction.–2014.–V.148(5).–P.71–84.
56. Bart J., Groen H.J., van der Graaf W.T. An oncological view on the blood-testis barrier // Lancet. Oncol.–2002.–V.3.–№6.–P.357–363.

57. Bedford J.M., Bent M.J., Calvin H. Variations in the structural character and stability of the nuclear chromatin in morphologically normal human spermatozoa // *J. Reprod. Fertil.*–1973.–V.33.–P.19–29.
58. Beisel C., Paro R. Silencing chromatin: comparing modes and mechanisms // *Nat. Rev. Genet.*–2011.–V.12(2).–P.123–135.
59. Bellve A.R. Introduction: The male germ cell; origin, migration, proliferation and differentiation // *Cell Dev. Biol.*–1998.–V.9.–P.379–371.
60. Birkhead T.R., Pellatt E.J., Brekke P., Yeates R., Castillo-Juarez H. Genetic effects on sperm design in the zebra finch // *Nature.*–2005.–V.434.–№7031.–P.383–387.
61. Björndahl L.; Kvist U. Human sperm chromatin stabilization: a proposed model including zinc bridges // *Molecular human reproduction.*–2010.–V.16.–P.23–29.
62. Björndahl L, Kvist U. Structure of chromatin in spermatozoa // *Adv. Exp. Med Biol.*–2014.–V.791.–P.1–11.
63. Boekelheide K., Lee J., Shipp E.B., Richburg J.H., Li G. Expression of Fas system-related genes in the testis during development and after toxicant exposure // *Toxicol. Letters.*–1998.–V.102.–P.503–508.
64. Boisvert F.M., van Koningsbruggen S., Navascués J., Lamond A.I. The multifunctional nucleolus // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*–2007.–V.8(7).–P.574–585.
65. Bolognesi C., Creus A., Ostrosky-Wegman P., Marcos R. Micronuclei and pesticide exposure // *Mutagenesis.*–2011.–V.26(1).–P.19–26.
66. Boyoglu C., He Q., Willing G., Boyoglu-Barnum S., Dennis V.A., Pillai S., Singh S.R. Microscopic Studies of Various Sizes of Gold Nanoparticles and Their Cellular Localizations // *ISRN Nanotechnol.*–2013.–V. 2013.–Article ID 123838.
67. Braydich-Stolle L., Hussain S., Schlager J.J., Hofmann M-C. In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells // *Toxicol. Sci.*–2005.–V.88.–P.412–419.
68. Braydich-Stolle L.K., Lucas B., Schrand A. et al. Silver Nanoparticles Disrupt GDNF/Fyn kinase Signaling in Spermatogonial Stem Cells // *Toxicol. Sci.*–2010.–V.116.–P.577–589.

69. Brinster R. Male germline stem cells: from mice to men // *Science*.–2007.–V.316.–P.404–405.
70. Brinster R.L. Germline stem cell transplantation and transgenesis // *Science*.–2002.–V.296.–№5576.–P.2174–2176.
71. Buzzard J.J., Wreford N.G., Morrison J.R. Marked extension of proliferation of rat Sertoli cells in culture using recombinant human FSH // *Reproduction*.–2002.–V.124.–P.633–641.
72. Carrell D.T., Emery B.R., Hammoud S. Altered protamine expression and diminished spermatogenesis: what is the link? // *Hum. Reprod. Update*.–2007.–V.13(3).–P.313–327.
73. Carrell D.T., Wilcox A.L., Lowy L. Elevated sperm chromosome aneuploidy and apoptosis in patients with unexplained recurrent pregnancy loss // *Obstet Gynecol*.–2003.–V.101.–P.1229–1235.
74. Chapman J.C., Michael S.D. Hypothesis. Open Access. Proposed mechanism for sperm chromatin condensation/decondensation in the male rat// *Reprod. Biol. Endocrinol*.–2003.–V.1.–P.20.
75. Chaudhary J., Cupp A.S., Skinner M.K. Role of basic-helix-loop-helix transcription factors in Sertoli cell differentiation: identification of an E-box response element in the transferring promoter // *Endocrinology*.–1997.–V.138.–№2.–P.667–675.
76. Chaudhary J., Sadler-Riggelman I., Ague J.M., Skinner M.K. The helix-loop-helix inhibitor of differentiation (ID) proteins induce post-mitotic terminally differentiated Sertoli cells to re-enter the cell cycle and proliferate // *Biol. Reprod*.–2005.–V.72.–№5.–P.1205–1217.
77. Cheng C.Y. Mruk D.D. Cell junction dynamics in the testis: Sertoli-germ cell interactions and male contraceptive development // *Phys. Rev*.–2002.–V.82.–№4.–P.825–874.
78. Cheng C.Y., Mruk D.D. The biology of spermatogenesis: the past, present and future // *Phil. Trans. R. Soc. B*.–2010.–V.365.–P.459–1463.

79. Chiarini-Garcia H., Hornick J.R., Griswold M.D., Russell L.D. Distribution of type A spermatogonia in the mouse is not random // *Biol. Reprod.*—2001.—V.65.—№4.—P.1179–1185.
80. Chiarini-Garcia H., Raymer A.M., Russell L.D. Non-random distribution of spermatogonia in rats: evidence of niches in the seminiferous tubules // *Reproduction.*—2003.—V.126.—№5.—P.669–680.
81. Cho C., Jung-Ha H., Willis W.D., Goulding E.H., Stein P., Xu Z., Schultz R.M., Hecht N.B., Eddy E.M. Protamine 2 deficiency leads to sperm DNA damage and embryo death in mice // *Biol Reprod.*—2003.—V.69.—P.211–217.
82. Chu D., Shakes D. Spermatogenesis // *Adv. Exp. Med. Biol.*—2013.—V.757.—P.171–203.
83. Chui K., Trivedi A., Cheng C. Y. Cherbavaz D.B., Dazin P. F., Huynh A. L.T., Mitchell J. B., Rabinovich G. A., Noble-Haeusslein L. J., and John C.M. Characterization and Functionality of Proliferative Human Sertoli Cells // *Cell Transplant.*—2011.—V.20.—P.619–635.
84. Codrington A.M., Hales B.F., Robaire B. Spermatogenic germ cell phase-specific DNA damage following cyclophosphamide exposure // *J. Androl.*—2004.—V.25.—№3.—P.354–362.
85. D’Occhio M.J., Hengstberger K.J., Johnston S.D. Biology of sperm chromatin structure and relationship to male fertility and embryonic survival // *Anim. Reprod. Sci.*—2007.—V.101.—P.1–17.
86. Dadoune J.-P. The nuclear status of human sperm cells // *Micron.*—1995.—V.26.—№4.—P.323–345.
87. Dadoune J.P., Pawlak A., Alfonsi M.F., Siffroi J.P. Identification of transcripts by macroarrays, RT-PCR and in situ hybridization in human ejaculated spermatozoa // *Mol. Hum. Reprod.*—2005.—V.11.—P.133–140.
88. de Rooij D.G., Russell L.D. All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask // *J. Androl.*—2000.—V.21.—P.776–798.
89. Doak S.H., Griffiths S.M., Manshian B. et al. Confounding experimental considerations in nanogenotoxicology // *Mutagenesis.*—2009.—V.24.—P.285–293.

90. Dobrinski I., Avarbock M., Brinster R. Germ cell transplantation from large domestic animals into mouse testes // *Mol. Reprod. Dev.*–2000.–V.57.–P.270–279.
91. Drumond A., Meistrich M., Chiarini-Garcia H. Spermatogonial morphology and kinetics during testis development in mice: a high-resolution light microscopy approach // *Reproduction.*–2011.–V.142(1). –P.145–155.
92. Duff D.G., Baiker A., Edwards P.P. A New Hydrosol of Gold Clusters. 1. Formation and Particle Size Variation // *Langmuir.*–1993.–V.9.–№9.–P.2301–2309.
93. Dufour J.M., Rajotte R.V., Korbitt G.S. Development of an *in vivo* model to study testicular morphogenesis // *J Androl.*–2002.–V.23.–P.635–644.
94. Dufour J.M., Rajotte R.V., Seeberger K., Kin T., Korbitt G.S. Long-term survival of neonatal porcine Sertoli cells in non-immunosuppressed rats // *Xenotransplantation.*–2003.–V.10.–№6.–P.577–586.
95. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. Uptake of Engineered Gold Nanoparticles into Mammalian Cells // *Chem. Rev.*–2014.–V.114.–№2.–P.1258–1288.
96. Eagle H. Nutritional needs of mammalian cells in tissue culture // *Science.*–1955.–V.122.–P.501–504.
97. Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S., Nakanishi J. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials // *Reproductive toxicology.*–2010.–V.30.–V.I.3.–P.343–352.
98. Fallarino F., Luca G., Calvitti M., Mancuso F., Nastruzzi C., Fioretti M.C., Grohmann U., Becchetti E., Burgevin A., Kratzer R., van Endert P., Boon L., Puccetti P., Calafiore R. Therapy of experimental type 1 diabetes by isolated Sertoli cell xenografts alone // *J. Exp. Med.*–2009.–V.206.–№11.–P.2511–2526.
99. Fan Y.O, Zhang Y.H, Zhang X.P. et al. Comparative study of nanosized and microsized silicon dioxide on spermatogenesis function of male rats // *Wei Sheng Yan Jiu.*–2006.–V.35.–P.549–553.
100. Fan P., He L., Pu D., Lv X., Zhou W., Sun Y., Hu N. Testicular Sertoli cells influence the proliferation and immunogenicity of co-cultured endothelial cells // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*–2011.–V.404.–№3.–P.829–833.

101. Fenech M., Kirsch-Volders M., Natarajan A.T., Surralles J., Crott J. W., Parry J., Norppa H., Eastmond D.A., Tucker J.D., Thomas P. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells // *Mutagenesis*.—2011.—V.26.—№1.—P.125–132.
102. Filippini A., Riccioli A., Padula F. Control and impairment of immune privilege in the testis and in semen // *Hum. Reprod. Update*.—2001.—V.7.—№5.—P.444–449.
103. Franke F.E., Pauls K., Rey R., Marks A., Bergmann M., Steger K. Differentiation markers of Sertoli cells and germ cells in fetal and early postnatal human testis // *Anat. Embryol. (Berl)*. 2004. V.209. №2. P.169–177.
104. Fromm M.F. Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers // *Trends. Pharmacol. Sci.*—2004.—V.25.—№8.—P.423–429.
105. Fuentes-Mascorro G., Vergara-Onofre M., Mercado E. et al. Participation of DNA structure on sperm chromatin organization // *Systems Biol. Reprod. Med.*—2000.—V.45.—№1.—P.61–71.
106. Gao F., Maiti S., Alam N., Zhang Z., Deng J.M., Behringer R.R., Lecureuil C., Guillou F., Huff V. The Wilms tumor gene, *Wt1*, is required for *Sox9* expression and maintenance of tubular architecture in the developing testis // *PNAS*.—2006.—V.103.—P.11987–11992.
107. Gassei K., Ehmcke J., Schlatt S. Initiation of testicular tubulogenesis is controlled by neurotrophic tyrosine receptor kinases in a three-dimensional Sertoli cell aggregation assay // *Reproduction*.—2008.—V.136.—P.459–469.
108. Gassei K., Schlatt S., Ehmcke J. De novo morphogenesis of seminiferous tubules from dissociated immature rat testicular cells in xenografts // *J. Androl.*—2006.—V.27.—P.611–618.
109. Geens M., De Block G., Goossens E., Frederickx V., Van Steirteghem A., Tournaye H. Spermatogonial survival after grafting human testicular tissue to immunodeficient mice // *Hum. Reprod.*—2006.—V.21.—P.390–396.
110. Ghabriel M.N., Lu J.J., Hermanis G., Zhu C., Setchell B.P. Expression of a blood-brain barrier-specific antigen in the reproductive tract of the male rat // *Reproduction*.—2002.—V.123.—№3.—P.389–397.

111. Gioia L., Barboni B., Turriani M. et al. The capability of reprogramming the male chromatin after fertilization is dependent on the quality of oocyte maturation// *Reproduction*.–2005.–V.130(1).–P.29–39.
112. Gohbara A., Katagiri K., Sato T., Kubota Y., Kagechika H., Araki Y., Araki Y., Ogawa T. *In vitro* murine spermatogenesis in an organ culture system // *Biol. Reprod.*–2010.–V.83.–№2.–P.261–267.
113. Goossens E, Tournaye H. Is there a clinical future for spermatogonial stem cells? // *Curr. Stem Cell Res. Ther.*–2007.–V.2.–№3.–P.189–195.
114. Gosden R., Aubard Y. Why transplant gonadal tissue? In: *Transplantation of Ovarian and Testicular Tissues // Medical Intelligence Unit, R.G. Landes Co.*–1996.–P.1–15.
115. Gosden R.G., Nagano M. Preservation of fertility in nature and ART // *Reproduction*.–2002.–V.123.–№1.–P.3–11.
116. Grenier L., Robaire B., Hales B.F. Paternal exposure to cyclophosphamide affects the progression of sperm chromatin decondensation and activates a DNA damage response in the prepronuclear rat zygote // *Biology of Reproduction*.–2010.–V.83.–P.195–204.
117. Griswold M.D. Interactions between germ cells and Sertoli cells in the testis // *Biol. Reprod.*–1995.–V.52.–№2.–P.211–216.
118. Griswold M.D. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis // *Cell Dev. Biol.*–1998.–V.9.–P.411–416.
119. Guibert E., Briere S., Pelletier R., Brillard J., Froment P. Characterization of chicken Sertoli cells *in vitro* // *Poult. Sci.*–2011.–V.90.–P.1276–1286.
120. Guo Y., Hai Y, Gong Y., Li Z., He Z. Characterization, isolation, and culture of mouse and human spermatogonial stem cells // *J. Cell Physiol.*–2014.–V.229(4). – P.407–413.
121. Guttenbach M., Martínez-Expósito M.J., Engel W., Schmid M. Interphase chromosome arrangement in Sertoli cells of adult mice // *Biol Reprod.*–1996.–V.54(5).–P.980–986.

122. Hadley M.A., Byers S.W., Suárez-Quian C.A., Djakiew D., Dym M. In vitro models of differentiated Sertoli cell structure and function // *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant.*–1988.–V.24.–№6.–P.550–557.
123. Haider S.G. Cell biology of Leydig cells in the testis // *Int. Rev. Cytol.*–2004.–V.233.–P.181–241.
124. Hammadeh M.E., Kuhnen A., Amer A.S., Rosenbaum P., Schmidt W. Comparison of sperm preparation methods: Effect on chromatin and morphology recovery rates and their consequences on the clinical outcome after in vitro fertilization embryo transfer // *Int. J. Androl.*–2001.–V.24.–P.360–368.
125. Handel M.A., Sun F. Regulation of meiotic cell divisions and determination of gamete quality: impact of reproductive toxins // *Seminars in reproductive medicine.*–2005.–V.23.–№3.–P.212–221.
126. Hardy K., Wright C., Rice S. et al. Future developments in assisted reproduction in humans // *Reproduction.*–2002.–V.123.–№2.–P.171–183.
127. Heckert L.L., Griswold M.D. The expression of the follicle-stimulating hormone receptor in spermatogenesis // *Recent Prog. Horm. Res.*–2002.–V.57.–P.129–148.
128. Hernandez-Ochoa I., Sanchez-Gutierrez M., Solis-Heredia M.J., Quintanilla-Vega B. Spermatozoa nucleus takes up lead during the epididymal maturation altering chromatin condensation // *Reprod. Toxicol.*–2006.–V.21.–P.171–178.
129. Hernandez-Verdun D. The nucleolus: a model for the organization of nuclear functions // *Histochem. Cell Biol.*–2006.–V.126(2).–P.135–148.
130. Hernandez-Verdun D., Gautier T. The chromosome periphery during mitosis // *Bioessays.*–1994.–V.16(3).–P.179–185.
131. Hernandez-Verdun D., Hubert J., Bourgeois C.A., Bouteille M. Ultrastructural localization of Ag-NOR stained proteins in the nucleolus during the cell cycle and in other nucleolar structures // *Chromosoma.*–1980.–V.79(3).–P.349–362.
132. Hoet P.H.M., Brüske-Hohlfeld I., Salata O.V. Nanoparticles – known and unknown health risks // *J. Nanobiotechnology.*–2004.–V.2.–P.1477–3155.
133. Honaramooz A., Behboodi E., Blash S., Megee S., Dobrinski I. Germ cell transplantation in goats // *Mol. Reprod. Dev.*–2003.–V.64.–P.422–428.

134. Honaramooz A., Cui X., Kim N., Dobrinski I. Porcine embryos produced after intracytoplasmic sperm injection using xenogeneic pig sperm from neonatal testis tissue grafted in mice // *Reprod. Fert. Devel.*–2008.–V.20.–P.802–807.
135. Honaramooz A., Li M., Penedo C.T., Meyers S., Dobrinski I. Accelerated maturation of primate testis by xenografting into mice // *Biol. Reprod.*–2004.–V.70.–P.1500–1503.
136. Honaramooz A., Megee S., Dobrinski I. Germ cell transplantation in pigs // *Biol. Reprod.*–2002a.–V.66.–P.21–28.
137. Honaramooz A., Megee S., Rathi R., Dobrinski I. Building a testis: Formation of functional testis tissue after transplantation of isolated porcine (*Sus scrofa*) testis cells // *Biol. Reprod.*–2007.–V.76.–P.43–47.
138. Honaramooz A., Snedaker A., Bioani M., Schöler H., Dobrinski I., Schlatt S. Sperm from neonatal testes grafted in mice // *Nature.*–2002b.–V.418.–P.778–781.
139. Hooley R.P., Paterson M., Brown P. et al. Intra-testicular injection of adenoviral constructs results in Sertoli cell-specific gene expression and disruption of the seminiferous epithelium // *Reproduction.*–2009.–V.137.–P.361–370.
140. Hovatta O. Cryopreservation of testicular tissue in young cancer patients // *Hum. Reprod. Upd.*–2001.–V.7.–№4.–P.378–383.
141. Howell W.M., Black D.A. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method // *Experientia.* 1980. V.36(8). P.1014-1015.
142. Huang Y., Fenech M., Shi Q. Micronucleus formation detected by live-cell imaging // *Mutagenesis.*–2011.–V.26.–№1.–P.133–138.
143. Huleihel M., Lunenfeld E. Regulation of spermatogenesis by paracrine/autocrine testicular factors // *Asian J. Androl.*–2004.–V.6.–№3.–P.259–268.
144. Huret J.L. Effect of cryopreservation on the nuclear chromatin decondensation ability of human spermatozoa // *Arch. Androl.*–1984.–V.12.–P.33–38.
145. Hutson J.C. The effects of various hormones on the surface morphology of testicular cells in culture // *Am J Anat.*–1978.–V.151.–№1.–P.55–69.

146. Iavicoli I., Fontana L., Leso V., Bergamaschi A. The effects of nanomaterials as endocrine disruptors // *Int. J. Mol Sci.*–2013.–V.14(8).–P.16732–16801.
147. Irez T., Sahmay S., Ocal P., Goymen A., Senol H., Erol N., Kaleli S., Guralp O. Investigation of the association between the outcomes of sperm chromatin condensation and decondensation tests, and assisted reproduction techniques // *Andrologia.*–2014.–V.27.
148. Iwamori N. Regulation of spermatogonial stem cell compartment in the mouse testis // *Fukuoka Igaku Zasshi.*–2014.–V.105(1).–P.1–10.
149. Izadyar F., Den Ouden K., Stout T.A., Stout J., Coret J., Lankveld D.P., Spoormakers T.J., Colenbrander B., Oldenbroek J.K., Van der Ploeg K.D., Woelders H., Kal H.B., De Rooij D.G. Autologous and homologous transplantation of bovine spermatogonial stem cells // *Reproduction.*–2003.–V.126.–P.765–774.
150. Jamsai D, O'Bryan MK. Mouse models in male fertility research // *Asian J. Androl.*–2011.–V.13.–№1.–P.139–151.
151. Janecki A., Steinberger A. Polarized Sertoli cell functions in a new two-compartment culture system // *Journal of Andrology.*–1986.–V.7.–№1.–P.69–71.
152. Johansson L., Pellicciari C.E. Lead-induced changes in the stabilization of the mouse sperm chromatin // *Toxicology.*–1988.–V.51.–P.11–24.
153. Johnson T., Irwig M. The hidden world of self-castration and testicular self-injury // *Nat. Rev. Urol.*–2014.–V.11(5).–P.297–300.
154. Johnston H.J., Hutchison G., Christensen F.M., Peters S., Hankin S., Stone V. / A review of the in vivo and in vitro toxicity of silver and gold particulates: Particle attributes and biological mechanisms responsible for the observed toxicity // *Crit. Rev. Toxicol.*–2010.–V.40.–№4.–P.328–346.
155. Juul A., Almstrup K., Andersson A., Jensen T., Jørgensen N., Main K., Rajpert-De Meyts E., Toppari J., Skakkebaek N. Possible fetal determinants of male infertility // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2014.–V.10(9).–P.553–562.
156. Katib AA, Al-Hawsawi K, Motair W, Bawa AM. Secondary infertility and the aging male, overview // *Cent. European J. Urol.*–2014.–V.67(2).–P.184–188.

157. Kawasaki Y, Nakagawa A, Nagaosa K. et al. Phosphatidylserine binding of class B scavenger receptor type I, a phagocytosis receptor of testicular Sertoli cells // *J. Biol. Chem.*—2002.—V.277.—№30.—P.27559–27566.
158. Keros V, Hultenby K, Borgström B, Fridström M, Jahnukainen K, Hovatta O. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment // *Hum. Reprod.*—2007.—V.22.—№5.—P.1384–1395.
159. Ketola I., Rahman N., Toppari J., Bielinska M., Porter-Tinge S.B., Tapanainen J.S., Huhtaniemi I.T., Wilson D. B., Heikinheimo M. Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis // *Endocrinology.*—1999.—V.140.—№3.—P.1470–1480.
160. Khlebtsov N., Dykman L. Biodistribution and toxicity of engineered gold nanoparticles: a review of *in vitro* and *in vivo* studies // *Chem. Soc. Rev.*—2011.—V.40(3).—P.1647–1671.
161. Kiger A.A., Fuller M.T. Male germ-line stem cells // In: *Stem Cell Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.—2001.—P.149–187.
162. Kim Y., Selvaraj V., Pukazhenthil B., Travis A. Effect of donor age on success of spermatogenesis in feline testis xenografts // *Reprod. Fertil. Dev.*—2007.—V.19.—P.869–876.
163. Kim Y., Turner D., Nelson J., Dobrinski I., McEntee M., Travis A.J. Production of donor-derived sperm after spermatogonial stem cell transplantation in the dog // *Reproduction.*—2008.—V.136.—P.823–831.
164. Kimmins S., Sassone-Corsi P. Chromatin remodeling and epigenetic features of germ cells // *Nature.*—2005.—V.434.—№7033.—P.583–588.
165. Kin T., Rajotte R.V., Dufour J.M., Korbitt G.S. Development of an immunoprivileged site to prolong islet allograft survival // *Cell Transplant.*—2002.—V.11.—P.547–552.
166. Kioussis D. Gene regulation: kissing chromosomes // *Nature.*—2005.—V.435.—№7042.—P.579–580.

167. Kita K., Watanabe T., Ohsaka K., Hayashi H., Kubota Y., Nagashima Y., Aoki I., Taniguchi H., Noce T., Inoue K., Miki H., Ogonuki N., Tanaka H., Ogura A., Ogawa T. Production of functional spermatids from mouse germline stem cells in ectopically reconstituted seminiferous tubules // *Biol. Reprod.*–2007.–V.76.–P.211–217.
168. Kodani M., Kodani K. The *in vitro* cultivation of mammalian Sertoli cells // *Proc. Natl. Acad. Sci.*–1966.–V.56.–№4.–P.1200–1206.
169. Koji T., Hishikawa Y. Germ cell apoptosis and its molecular trigger in the mouse testis // *Arch. Histol. Cytol.*–2003.–V.66.–№1.–P.1–16.
170. Krzanowska H., Bilińska B. Number of chromocentres in the nuclei of mouse Sertoli cells in relation to the strain and age of males from puberty to senescence // *J. Reprod. Fertil.*–2000.–V.118(2).–P.343–350.
171. Kuriyama K., Kitamura T., Yokoi K. et al. Evaluation of testicular toxicity and sperm morphology in rats treated with methyl methanesulphonate (MMS) // *J. Reprod. Develop.*–2005.–V.51.–№5.–P.657–667.
172. Kvist U. Sperm nuclear chromatin decondensation ability // *Acta Physiol. Scand.*–1980.–P.1–24.
173. Laberge R.-M., Boissonneault G. Chromatin remodeling in spermatids: A sensitive step for the genetic integrity of the male gamete // *Archives Androl.*–2005.–V.51.–P.125–133.
174. Lan Z., Yang W. Nanoparticles and spermatogenesis: how do nanoparticles affect spermatogenesis and penetrate the blood-testis barrier // *Nanomedicine.*–2012.–V.7(4).–P.579–596.
175. Landsiedel R., Kapp M.D., Schulz M. et al. Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations - many questions, some answers // *Mutat. Res.*–2009.–V.681.–P.241–258.
176. Lee J., Richburg J.H., Shipp E.B. et al. The Fas system, a regulator of testicular germ cell apoptosis, is differentially up-regulated in Sertoli cell versus germ cell injury of the testis // *Endocrinology.*–1999.–V.140.–№2.–P.852–858.

177. Lee J., Richburg J.H., Younkin S.C., Boekelheide K. The Fas system is a key regulator germ cell apoptosis in the testis // *Endocrinology*.–1997.–V.138.–№5.–P.2081–2088.
178. Lo S.J., Lee C.C., Lai H.J. The nucleolus: reviewing oldies to have new understandings // *Cell Res*.–2006.–V.16(6).–P.530–538.
179. Loftis J.M. Sertoli cell therapy: A novel possible treatment strategy for treatment-resistant major depressive disorder // *Med Hypotheses*.–2011.– V.77(1).–P.35–42.
180. Louis B.G., Fritz I.B. Stimulation by androgens of the production of androgen binding protein by cultured Sertoli cells // *Mol. Cell. Endocrinol*.–1977.–V.7.–№1.–P.9–16.
181. Lucas T., Nascimento A., Pisolato R., Pimenta M., Lazari M., Porto C. Receptors and signaling pathways involved in proliferation and differentiation of Sertoli cells // *Spermatogenesis*.–2014.–V.4.
182. Luetjens C.M., Weinbauer G.F., Wistuba J. Primate spermatogenesis: new insights into comparative testicular organization, spermatogenic efficiency and endocrine control // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc*.–2005.–V.80.–№3.–P.475–488.
183. Lui W.Y., Mruk D., Lee W.M., Cheng C.Y. Sertoli cell tight junction dynamics: their regulation during spermatogenesis // *Biol. Reprod*.–2003.–V.68.–№4–P.1087–1097.
184. Maeda Y. Shiratsuchi A. Namiki M. Nakanishi Y. Inhibition of sperm production in mice by annexin V microinjected into seminiferous tubules: possible etiology of phagocytic clearance of apoptotic spermatogenic cells and male infertility // *Cell Death Differ*.–2002.–V.9.–№7.–P.742–749.
185. Mäkelä J., Toppari J., Rivero-Müller A., Ventelä S. Reconstruction of mouse testicular cellular microenvironments in long-term seminiferous tubule culture // *PLoS One*.–2014.–V.9(3).–P.88–96.
186. Marcon L., Zhang X., Hales B., Robaire B., Nagano M. Effects of chemotherapeutic agents for testicular cancer on rat spermatogonial stem/progenitor cells // *J. Androl*.–2011.–V.32(4).–P.432–443.

187. Marushige Y., Marushige K. Enzymatic unpacking of bull sperm chromatin // *Biochim. Biophys. Acta.* –1975.–V.403.–P.180–191.
188. Matoba S., Ogura A. Generation of functional oocytes and spermatids from fetal primordial germ cells after ectopic transplantation in adult mice // *Biol. Reprod.*–2011.–V.84(4)–P.631–638.
189. Meachem S.J., Ruwanpura S.M., Ziolkowski J., Ague J.M., Skinner M.K., Loveland K.L. Developmentally distinct in vivo effects of FSH on proliferation and apoptosis during testis maturation // *J. Endocrinol.*–2005.–V.186.– P.429–446.
190. Medrano J., Martínez-Arroyo A., Sukhwani M., Noguera I., Quiñonero A., Martínez-Jabaloyas J., Pellicer A., Remohí J., Orwig K., Simón C. Germ cell transplantation into mouse testes procedure // *Fertil. Steril.*–2014.–V.102(4). –P.11–12.
191. Meistrich M.L. Critical components of testicular function and sensitivity to disruption // *Biol. Reprod.*–1986.–V.34.–№1.–P.17–28.
192. Meistrich M.L. Evaluation of reproductive toxicity by testicular sperm head counts // *J. Am. Coll. Toxic.*–1989.–V.8.–№3.–P.551–567.
193. Melaine N., Lienard M.O., Dorval I. et al. Multidrug resistance genes and p-glycoprotein in the testis of the rat, mouse, Guinea pig, and human // *Biol. Reprod.*–2002.–V.67.–№6.–P.1699–1707.
194. Miresmaeili S., Halvaei I., Fesahat F., Fallah A., Nikonahad N., Taherinejad M. Evaluating the role of silver nanoparticles on acrosomal reaction and spermatogenic cells in rat // *Iran J. Reprod. Med.*–2013.–V.11(5).–P.423–430.
195. Moretti E., Terzuoli G., Renieri T., Iacoponi F., Castellini C., Giordano C., Collodel G. *In vitro* effect of gold and silver nanoparticles on human spermatozoa // *Andrologia.*–2012.–V.45.–№6.–P.392–396.
196. Mruk D.D., Cheng C.Y. Sertoli-Sertoli and Sertoli-germ cell interactions and their significance in germ cell movement in the seminiferous epithelium during spermatogenesis // *Endocrinol. Rev.*–2004.–V.25.–№5.–P.747–806.
197. Müller W.-U., Streffer C. Micronucleus assays // In: *Advances in mutagenetic research.*–1994.–V.5.–P.3–135.

198. Murphy C.J., Gole A.M., Stone J.W., Sisco P.N., Alkilany A.M., Goldsmith E.C., Baxter S.C. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging // *Acc. Chem. Res.*–2008.–V.41.–№12.–P.1721–1730.
199. Myers M., Ebling F. J. P., Nwagwu M. Atypical development of Sertoli cells and impairment of spermatogenesis in the hypogonadal (hpg) mouse // *J. Anat.*–2005.–V.207.–P.797–811.
200. Nagano N., McCarrey J., Brinster R. Primate spermatogonial stem cells colonize mouse testis // *Biol. Reprod.* –2001.–V.64.–P.1409–1416.
201. Nagano N., Patrizio P., Brinster R. Long-term survival of human spermatogonial stem cells in mouse testes // *Fertil. Steril.*–2002.– V.78.–P.1225–1233.
202. Nakanishi Y., Shiratsuchi A. Phagocytic removal of apoptotic spermatogenic cells by Sertoli cells: mechanisms and consequences // *Biol. Pharm. Bull.*–2004.–V.27.–№1.–P.13–16.
203. Ng C-T., Li J.J., Bay B-H., Yung L-Y.L. Current studies into genotoxic effects of nanomaterials // *J. Nucleic. Acids.*–2010.–V.2010.–P.947859.
204. Noori A., Parivar K., Modaresi M. et al. Effect of magnetic iron oxide nanoparticles on pregnancy and testicular development of mice // *African J. Biotechnol.*–2011.–V.10.–P.1221–1227.
205. Oakberg E.F., Huckins C. Spermatogonial stem cell renewal in the mouse as revealed by H3–thymidine labeling and irradiation // *Stem cell of renewing cell populations.*–Cambridge Akad. Press.–1976.–P.287–302.
206. Oatley J.M., Reeves J.J., McLean D.J. Establishment of spermatogenesis in neonatal bovine testicular tissue following ectopic xenografting varies with donor age // *Biol. Reprod.*–2005.–V.72.–P.358–364.
207. Oatley M.J., Racicot K.E., Oatley J.M. Sertoli cells dictate spermatogonial stem cell niches in the mouse testis // *Biol. Reprod.*–2011.– V.84.–№4.–P.639–645.
208. Ogawa T., Arechaga J.M., Avarbock M.R. and Brinster R.L. Transplantation of testis germinal cells into mouse seminiferous tubules // *Int. J. Dev. Biol.*–1997.–V.41.–P.111–122.

209. Ogawa T., Dobrinski I., Avarbock M., Brinster R. Xenogeneic spermatogenesis following transplantation of hamster germ cells to mouse testes // *Biology of Reproduction*.–1999.–V.60.–P.515–521.
210. Ohta H., Yomogida K., Dohmae K., Nishimune Y. Regulation of proliferation and differentiation in spermatogonial stem cells: the role of c-kit and its ligand SCF // *Development*.–2000.–V.127.–№10.–P.2125–2131.
211. Oliva R. Protamines and male infertility // *Hum. Reprod. Update*.–2006.–V.12.–P.417–435.
212. Paranko J., Kallajoki M., Pelliniemi L.J., Lehto V.P., Virtanen I. Transient coexpression of cytokeratin and vimentin in differentiating rat Sertoli cells // *Dev. Biol*.–1986.–V.117.–№1.–P.35–44.
213. Perek N., Denoyer D. The multidrug resistance mechanisms and their interactions with the radiopharmaceutical probes used for an *in vivo* detection // *Curr. Drug. Metab*.–2002.–V.3.–№1.–P.97–113.
214. Popova E., Krivokharchenko A., Ganten D., Bader M. Efficiency of transgenic rat production is independent of transgene-construct and overnight embryo culture // *Theriogenology*.–2004.–V.61.–P.1441–1453.
215. Print C.G., Loveland K.L. Germ cell suicide: new insights into apoptosis during spermatogenesis // *BioEssays*.–2000.–V.22.–№5.–P.423–429.
216. Puglisi R., Montanari M., Chiarella P., Stefanini M., Boitani C. Regulatory role of BMP2 and BMP7 in spermatogonia and Sertoli cell proliferation in the immature mouse // *Eur. J. Endocrinol*.–2004.–V.151.–P.511–520.
217. Qiu J., Hales B.F., Robiere B. Effects of chronic low-dose cyclophosphamide exposure on the nuclei of rat spermatozoa // *Biol. Reprod*.–1995.–V.52.–P.33–40.
218. Rajender S., Agarwa A. Aberrant Epigenetic Modifications in Male Infertility // *The Open Reprod. Sci. J*.–2011.–V.3.–P.57–64.
219. Ramm S., Schärer L., Ehmcke J., Wistuba J. Sperm competition and the evolution of spermatogenesis // *Mol. Hum. Reprod*.–2014.–V.–20(12).–P.1169–1179.
220. Reda A., Hou M., Landreh L., Kjartansdóttir K., Svechnikov K., Söder O., Stukenborg J. *In vitro* Spermatogenesis - Optimal Culture Conditions for Testicular

- Cell Survival, Germ Cell Differentiation, and Steroidogenesis in Rats // *Front Endocrinol.*–2014.–V.26.–P.5–21.
221. Reuter K., Ehmcke J., Stukenborg J., Simoni M., Damm O., Redmann K., Schlatt S., Wistuba J. Reassembly of somatic cells and testicular organogenesis *in vitro* // *Tissue Cell.*–2014.–V.46(1).–P.86–96.
222. Rey, R., Lukas-Croisier, C., Lasala, C., Bedecarrás, P. AMH/MIS: What we know already about the gene, the protein and its regulation // *Mol. Cell. Endocrinol.*–2003.–V.211.–P.21–31.
223. Rodriguez-Sosa J.R., Dobrinski I. Recent developments in testis tissue xenografting // *Reproduction.*–2009.–V.138.–P.187–194.
224. Rodriguez-Sosa J.R., Dobson H., Hahnel A. Isolation and transplantation of spermatogonia in sheep // *Theriogenology.*–2006.–V.66.–P.2091–2103.
225. Rudak E., Jacobs P.A., Yanagimachi R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa // *Nature.*–1978.–V.274.–P.911–912.
226. Russell L., Nirmal K., Weber S. Intratesticular injection as a method to assess the potential toxicity of various agents and to study mechanisms of normal spermatogenesis // *Gamete Research.*–1987.–V.17(1).– P.43–56.
227. Sadri-Ardekani H., Atala A. Regenerative medicine for the treatment of reproductive system disorders: Current and potential options // *Adv. Drug Deliv. Rev.*–2014.
228. Sánchez-vázquez M. L., Reyes R., Delgado N.M. et al. Differential Decondensation of Class I (Rat) and Class II (Mouse) Spermatozoa Nuclei by Physiological Concentrations of Heparin and Glutathione // *Systems Biology in Reproductive Medicine.*–1996.–V.36.–P.161–176.
229. Sanchez-Vazquez M.L., Reyes R., Ramirez G. et al. DNA unpacking in guinea pig sperm chromatin by heparin and reduced glutathione // *Arch. Androl.*–1998.–V.40.–P.15–28.
230. Sato T., Katagiri K., Gohbara A., Inoue K., Ogonuki N., Ogura A., Kubota Y., Ogawa T. In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes // *Nature.*–2011.–V.471(7339).–P.504–507.

231. Sawyer D. E., Brown D. B. Diminished decondensation and DNA synthesis in activated sperm from rats treated with cyclophosphamide // *Toxicol. Lett.*–2000.–V.114.–P.19–26.
232. Schlatt S., Honaramooz A., Bioani M., Schöler R., Dobrinski I. Progeny from sperm obtained after ectopic grafting of neonatal mouse testes // *Biol. Reprod.*–2003.–V.68.–P.2331–2335.
233. Schlatt S., Honaramooz A., Ehmcke J., Goebell P.J., Rubben H., Dhir R., Dobrinski I., Patrizio P. Limited survival of adult human testicular tissue as ectopic xenograft // *Hum. Reprod.*–2006.–V.21.–P.384–389.
234. Schlatt S., Kim S., Gosden R. Spermatogenesis and steroidogenesis in mouse, hamster and monkey testicular tissue after cryopreservation and heterotopic grafting to castrated host // *Reproduction.*–2002.–V.124.–P.339–346.
235. Schlatt S., Rosiepen G., Weinbauer G.F., Rolf C., Brook P.F., Nieschlag E. Germ cell transfer into rat, bovine, monkey and human testes // *Hum. Reprod.*–1999.–V.14.–P.144–150.
236. Schulze W., Schulze C. Multinucleate Sertoli cells in aged human testis // *Cell and Tissue Research.*–1981.–V.217.–P.259–266.
237. Scott M.S., Boisvert F.M., Lamond A.I., Barton G.J. PNAC: a protein nucleolar association classifier // *BMC Genomics.*–2011.–V.12.–P.74
238. Seandel M., Rafii S. Reproductive biology: In vitro sperm maturation // *Nature.*–2011.–V.471(7339).–P.453–455.
239. Segal G.A., Owens J.G. Methylation of DNA and protamine by methyl methanesulfonate in the germ cells of male mice // *Mutat. Res.*–1983.–V.111.–P.227–244.
240. Sekido R., Lovell-Badge R. Sex determination involves synergistic action of SRY and SF1 on a specific Sox9 enhancer // *Nature.*–2008.–V.453.–P.930–934.
241. Sette C., Dolci S., Geremia R., Rossi P. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells // *Int. J. Dev. Biol.*–2000.–V.44.–P.599–608.

242. 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.
243. Shinohara T., Inoue K., Ogonuki N., Kanatsu-Shinohara M., Miki H., Nakata K., Kurome M., Nagashima H., Toyokuni S., Kogishi K. et al. Birth of offspring following transplantation cryopreserved immature testicular pieces and *in vitro* microinsemination // *Human Reproduction*.—2002.—V.17.—P.3039–3045.
244. Shinohara T., Orwig K.E., Avarbock M.R., Brinster R.L. Restoration of Spermatogenesis in Infertile Mice by Sertoli Cell Transplantation // *Biol. of Reprod.*—2003.—V.68.—P.1064–1071.
245. Sinha A., Rao A.R. Induction of shape abnormality and unscheduled DNA synthesis by arecoline in the germ cells of mice // *Mutat. Res.*—1985.—V.158.—P.189–192.
246. Siu M.K., Cheng C.Y. Dynamic cross-talk between cells and the extracellular matrix in the testis // *Bioessays*.—2004.—V.26.—№9.—P.978–992.
247. Sprando R., Black T., Ames M., Rorie J., Collins T. Effect of intratesticular injection of sodium fluoride on spermatogenesis // *Food Chem. Toxicol.* —1996.—V.34(4). —P.377–384.
248. Sreenivasa G., Kavitha P., Vineeth V., Channappa S., Malini S. Evaluation of *in vitro* sperm nuclear chromatin decondensation among different subgroups of infertile males in Mysore, India // *J. Res. Med. Sci.*—2012.—V.17(5).—P.456–460.
249. Steinberger A., Steinberger E. Factors affecting spermatogenesis in organ cultures of mammalian testes. // *J. Reprod. Fert.*—1967.—V.2—P.117–124.
250. Steinberger A., Steinberger E. *In vitro* growth and development of mammalian testes // In: *The Testis*.—New York: Academic Press.—1970.—P.363–391.
251. Steinberger A., Steinberger E., Perloff W.H. Mammalian testes in organ culture // *Exp. Cell Res.*—1964.—V.36.—P.19–27.
252. Sukanuma R., Yanagimachi R., Meistrich M.L. Decline in fertility of mouse sperm with abnormal chromatin during epididymal passage as revealed by ICSI // *Hum. Reprod.*—2005.—V.20.—P.3101–3108.

253. Tajima Y., Watanabe D., Koshimizu U., Matsuzawa T., Nishimune Y. Insulin-like growth factor-I and transforming growth factor-alpha stimulate differentiation of type A spermatogonia in organ culture of adult mouse cryptorchid testes // *Int. J. Androl.*–1995.–V.18.–P.8–12.
254. Takeda K., Suzuki K., Ishihara A., et al. Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems // *J. Health Sci.*–2009.–V.55.–P.95–102.
255. Tamaru H. Confining euchromatin/heterochromatin territory: jumonji crosses the line // *Genes Dev.*–2010.–V.24(14).–P.1465–1478.
256. Tarulli G., Stanton P., Meachem S. Is the adult Sertoli cell terminally differentiated? // *Biol. Reprod.* –2012. –V.1.–P.1–11.
257. Tajik P., Barin A., Movahedin M., Zarnani A. H., Hadavi R., Moghaddam G., Shoja J., Jeddi-Tehrani M., Ashrafi-Helan J., Heidari-Vala H., Torkabadi E., Qasemi-Panahi B. Nestin, a neuroectodermal stem cell marker, is expressed by bovine sertoli cells // *Comp. Clin. Pathol.*–2012.–V.21.–P.395–399.
258. Taylor U., Barchanski A., Garrels W., Klein S., Kues W., Barcikowski S., Rath D. Toxicity of Gold Nanoparticles on Somatic and Reproductive Cells // In: *Nanobiotechnology for Biomedical and Diagnostic Research.*–Adv. Exp. Med. Biol.–2012.–V.733.–P.125–133.
259. Taylor U., Barchanski A., Petersen S., Kues W.A., Baulain U., Gamrad L., Sajti L., Barcikowski S., Rath D. Gold nanoparticles interfere with sperm functionality by membrane adsorption without penetration // *Nanotoxicology.*– 2014.–V.8.–P.118–127.
260. Thakur M., Gupta H., Singh D., Mohanty I., Maheswari U., Vangae G., Joshi A. Histopathological and ultrastructural effects of nanoparticles on rat testis following 90 days (Chronic study) of repeated oral administration // *J. Nanobiotechnology.*–2014.–V.14–P.12–42.
261. Tiedemann D., Taylor U, Rehbock C., Jakobi J., Klein S., Kues W.A., Barcikowski S., Rath D. Reprotoxicity of gold, silver, and gold-silver alloy nanoparticles on mammalian gametes. *Analyst.*–2014.–V.139.–№ 5.–P.931–942.

262. Trivedi A.A., Igarashi T., Compagnone N., Fan X., Hsu J.Y., Hall D.E., John C.M., Noble-Haeusslein L.J. Suitability of allogeneic Sertoli cells for *ex vivo* gene delivery in the injured spinal cord // *Exp. Neurol.*—2006.—V.198.—P.88–100.
263. Trowell O. The culture of mature organs in a synthetic medium // *Exp. Cell Res.*—1959.—V.16.—P.118–147.
264. Turner C. Intra-ocular homotransplantations of prepubertal testes in the rat // *American Journal of Anatomy.*—1938.—V.63.—P.101–159.
265. Uryvaeva I.V. A model of hepatic regeneration and carcinogenesis due to total liver cell injury induced dipin and partial hepatectomy // *Monogr. Dev. Biol.*—1992.—V.23.—P.230–236.
266. Vergouwen R.P., Jacobs S.G., Huiskamp R., Davids J.A., de Rooij D.G. Proliferative activity of gonocytes, Sertoli cells and interstitial cells during testicular development in mice // *J. Reprod. Fertil.*—1991.—V.93.—P.233–243.
267. Viger R.S., Mertineit C., Trasler J.M., Nemer M. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Müllerian inhibiting substance promoter // *Development.*—1998.—V.125.—P.2665–2675.
268. Wachtler F., Stahl A. The nucleolus: a structural and functional interpretation // *Micron.*—1993.—V.24.—P.473–505.
269. Walker W.H., Cheng J. FSH and testosterone signaling in Sertoli cells // *Reproduction.*—2005.—V.130.—P.15–28.
270. Wang X., Qin J., Zhao R., Zenke M. Reduced immunogenicity of induced pluripotent stem cells derived from Sertoli cells // *PLoS One.*—2014.—V.28—№.9(8).
271. Ward W.S., Coffey D.S., DNA packaging and organization in mammalian spermatozoa: comparison with somatic cells // *Biol. Reprod.*—1991.—V.44.—P.569–574.
272. Weinbauer G., Galhotra M., Nieschlag E. Focal testicular destruction following intratesticular injection of glycerol in rats // *Int. J. Androl.*—1985.—V.8(5).—P.365–375.

273. Weinbauer G. F., Wessels J. 'Paracrine' control of spermatogenesis // *Andrologia*.–1999.–V.31.–P.249–262.
274. Wiwanitkit V., Sereemasapun A., Rojanathanes R. Effect of gold nanoparticles on spermatozoa: the first world report // *Fertil. Steril.*–2009.–V.91.–№1.–P.7–8.
275. Woolveridge I., de Boer-Brouwer M., Taylor M.F. et al. Apoptosis in the rat spermatogenic epithelium following androgen withdrawal: changes in apoptosis-related genes // *Biol. Reprod.*–1999.–V.60.–P.461–470.
276. Wyrobek A.J., Bruce W. The induction of sperm-shape abnormalities in mice and humans // *Chemical mutagens, Plenum press.*–N.Y.–London.–1978.–V.5.–P.258–286.
277. Wyrobek A.J., Watchmaker G., Gordon L. An evaluation of sperm tests as indicators of germ cell damage in men exposed to chemical or physical agents // *Teratog. Carcinog. Mutagen.*–1984.–V.4.–P.83–107.
278. Xu Y., Wang N., Yu Y., Li Y., Li Y., Yu Y., Zhou X., Sun Z. Exposure to silica nanoparticles causes reversible damage of the spermatogenic process in mice // *PLoS One*.–2014.–V.8.–№9(7).
279. Yevdokimov Yu. M., Skuridin S.G., Salyanov V.I. et al. A dual effect of Au-nanoparticles on nucleic acid cholesteric liquid-crystalline particles // *J. Biomater. Nanotechnol.*–2011.–V.2.–№4.–P.461–471.
280. Yoshida S., Hiyoshi K., Ichinose T., Takano H. et al. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice // *Int. J. Androl.*–2007.–V.32.–P.337–342.
281. Yoshida S., Hiyoshi K., Ichinose T. et al. Effect of nanoparticles on the male reproductive system of mice // *Int. J. Andrology.*–2008.–V.32.–P.337–342.
282. Yoshida S., Hiyoshi K., Oshio S. et al. Effects of fetal exposure to carbon nanoparticles on reproductive function in male offspring // *Fertility Sterility*.–2010.–V.93.–P.1695–1699.
283. Yoshioka H., McCarrey J.R., Yamazaki Y. Dynamic nuclear organization of constitutive heterochromatin during fetal male germ cell development in mice // *Biol. Reprod.*–2009.–V.80(4).–P.804–812.

284. Young R.J. Rabbit sperm chromatin is decondensed by a thiolinduced proteolytic activity not endogenous to its nucleus // *Biol. Reprod.*–1979.–V.20.– P.1001–1004.
285. Yu X., Hong S., Moreira E.G, Faustman E.M. Improving in vitro Sertoli cell/gonocyte co-culture model for assessing male reproductive toxicity: Lessons learned from comparisons of cytotoxicity versus genomic responses to phthalates // *Toxicol. Appl. Pharmacol.*–2009.–V.239.–№3.–P.325–336.
286. Zamudio N.M., Chong S., O’BryanM.K. Epigenetic regulation in male germ cells // *Reproduction.*–2008.–V.136.–P.131–146.
287. Zhang D.Y., He D.W., Wei G.H., Song X.F., Li X.L., In T. Long-term coculture of spermatogonial stem cells on sertoli cells feeder layer *in vitro* // *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.*–2008a.–V.39.–№1.–P.6–9.
288. Zhang X.S., Zhang Z.H., Jin X. et al. Dedifferentiation of adult monkey Sertoli cells through activation of ERK1/2 kinase induced by heat treatment // *Endocrinology.*–2006.–V.143.–№3.–P.1237–1245.
289. Zhang Z., Hill J., Holland M., Kurihara Y., Loveland K. Bovine sertoli cells colonize and form tubules in murine hosts following transplantation and grafting procedures // *Journal of Andrology.*–2008b.–V.29–P.418–430.
290. Zhang Z.H., Hu Z.Y., Song X.X. et al. Disrupted expression of intermediate filaments in the testis of rhesus monkey after experimental cryptorchidism // *Int. J. Androl.*–2004.–V.27.–№4.–P.234–239.
291. Zheng Y., Hunting D.J., Ayotte P., Sanche L. Radiosensitization of DNA by gold nanoparticles irradiated with high-energy electrons // *Radiat. Res.*–2008.–V.169.–P.19–27.
292. Zhou B., Hutson J.M. Human chorionic gonadotropin (hCG) fails to stimulate gonocyte differentiation in newborn mouse testes in organ culture // *J. Urol.*–1995.–V.153.–P.501–505.
293. Zirkin B.R., Soucek D.A., Chang T.S.K., Perreault S.D. // *Gamete Research.*–1985.–V.11.–P.349–365.