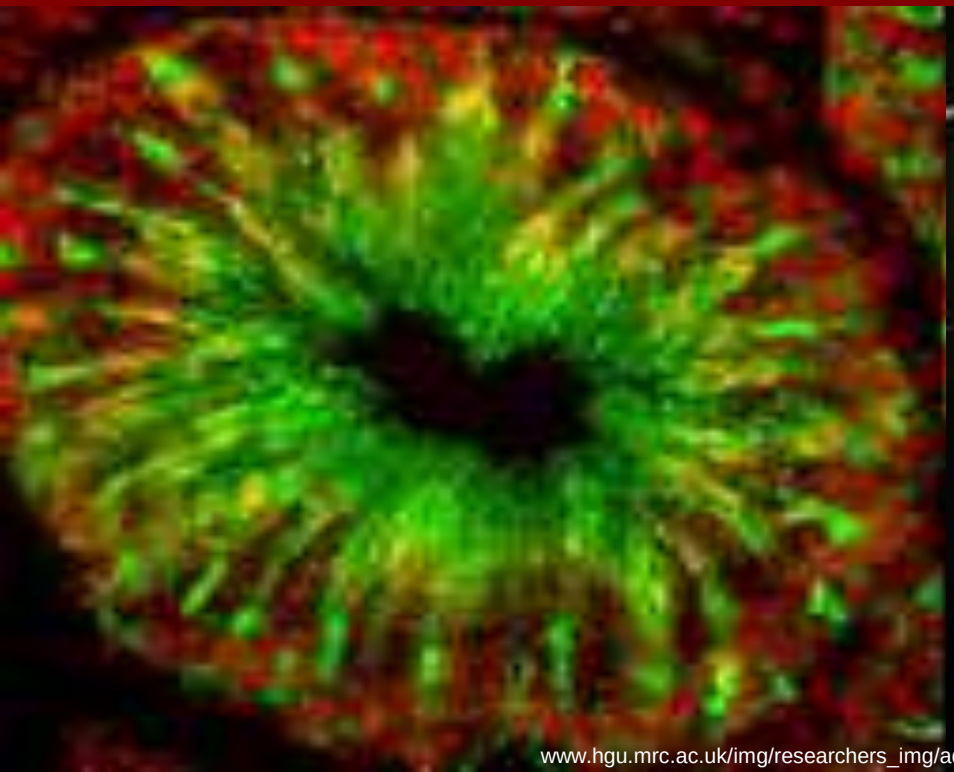
Сперматогенез: от начала до конца. Часть II.

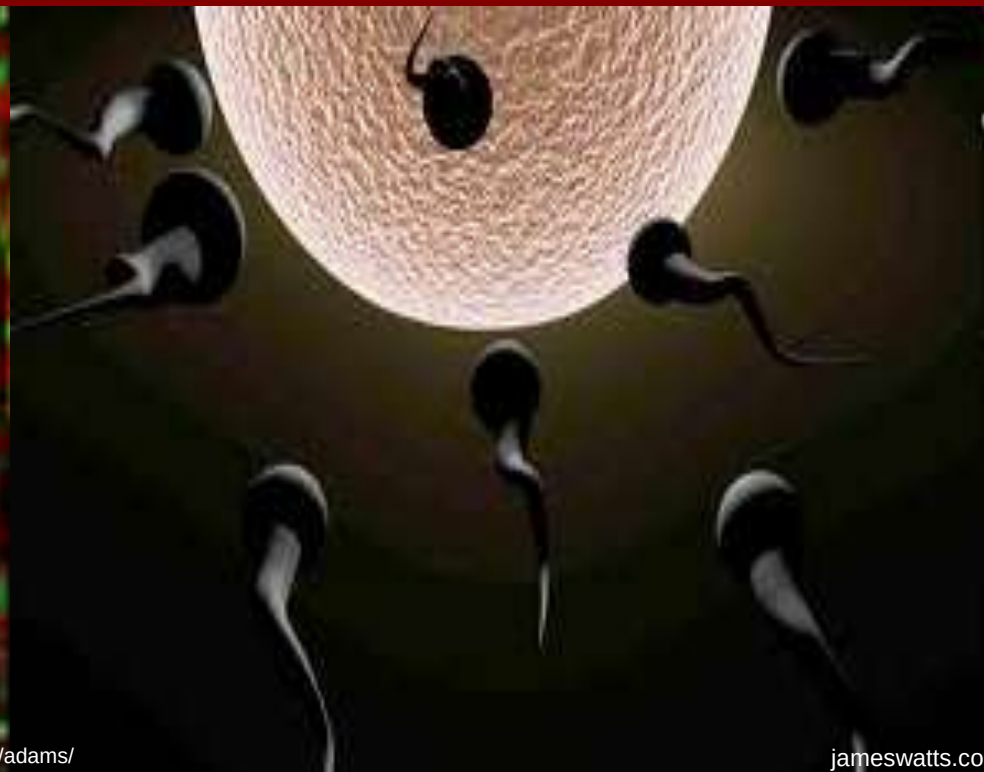
С.Т.Захидов
Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова
Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова, РАН

Сперматозоиды возникли не иначе как вместе с началом мира

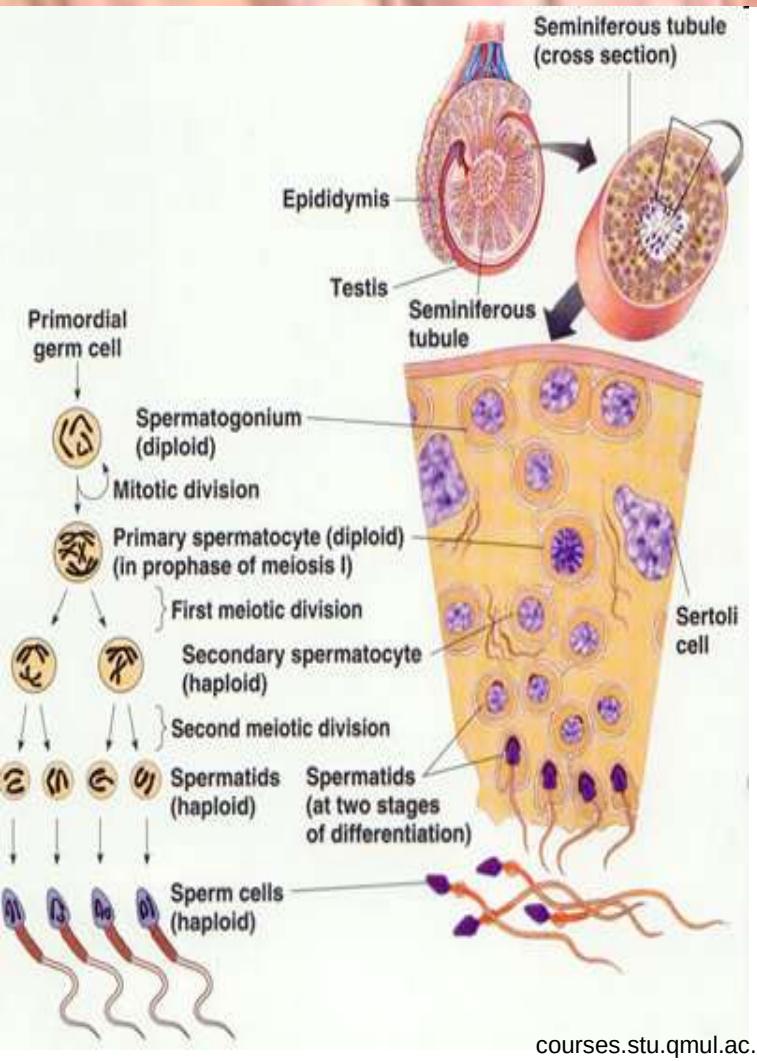
Готфрид Вильгельм фон Лейбниц,
немецкий математик и философ



www.hgu.mrc.ac.uk/img/researchers_img/adams/



jameswatts.co



courses.stu.qmul.ac.uk

Сперматогенез **– динамический процесс развития мужских половых клеток, находящийся под строгим генетическим и гормональным контролем, подчиняющийся пространственно-временным закономерностям. Он включает в себя такие процессы-явления как самообновление и коммитация** сперматогониальных стволовых клеток (***ССК***)**, пролиферация и апоптоз, дифференцировки и мейоз, репарации и регенерации.**

Кульминацией *сперматогенного процесса* является образование большого числа мобильных гамет, способных к автономному существованию и переносу отцовского генома в яйцеклетку.

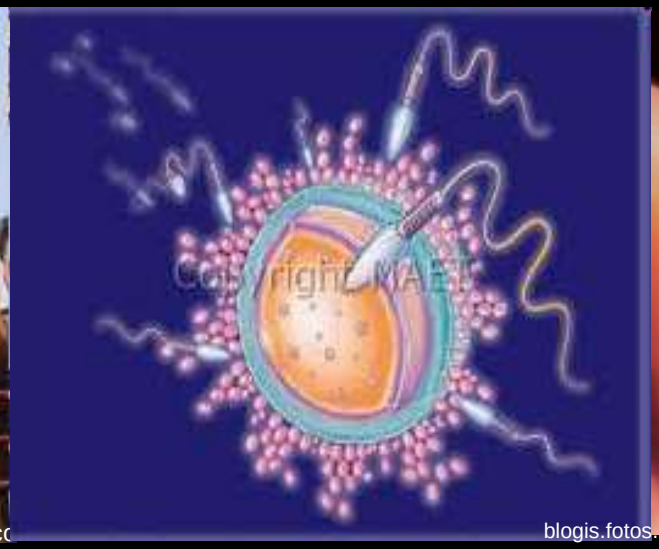
Сперматогенез возник в результате длительного эволюционного процесса и охватил практически весь мир эукариотических организмов.

lumen_with_sperm.jpg

С теоретической точки зрения ***сперматогенез*** представляет собой удобную модель для изучения многих важных проблем клеточной и репродуктивной биологии, генетики, радиобиологии.

Практическая значимость исследований также очевидна: в ряде случаев мужская стерильность или слабая плодовитость тесно связаны с нарушениями оплодотворяющей способности зрелых спермиев, либо с нарушениями нормального функционирования ***сперматогенного эпителия***, ведущими к массовой гибели клеток и, как следствие, олиго- или азооспермии.

Полные знания различных сторон ***сперматогенного процесса*** необходимы и потому, что служат надежной основой для получения значимых и стабильных результатов в области искусственного оплодотворения, криоконсервации, регуляции плодовитости животных и планирования семьи.



Итак, проблема ***сперматогенеза*** как раньше, так и теперь остается одной из центральных проблем биологии развития. Со ***сперматогенезом*** связаны вопросы размножения, оплодотворения и эмбриогенеза.

Специализированные, обособленные от соматических клеток, клетки для полового размножения впервые были обозначены гением Августом Вейсманом, как зародышевый путь – бессмертный путь Природы.

Зародышевый путь (или гаметогенезы), оторвавшийся от соматической эмбриональной системы и тем избежавший дифференцировки, т.е. «соматизации», обслуживающий исключительно только себя, представляет собой ряд поколений половых клеток – от первичных (примордиальных) половых клеток, появление которых совершается при дроблении у одних организмов в бластуле, у других – в гаструле, а у человека – в нейруле, до гамет у взрослых особей, уже способных к размножению.

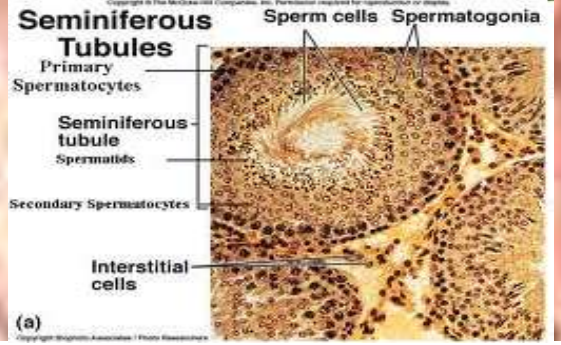
Половые клетки развиваются в таких эффективных термодинамических машинах, как гонады. Они обладают способностью воспроизводить вновь целое, а не только как прочие клетки лишь себе подобное. Только одни половые клетки не стареют, а неограниченно размножаются, в них заключена бессмертная часть тела.

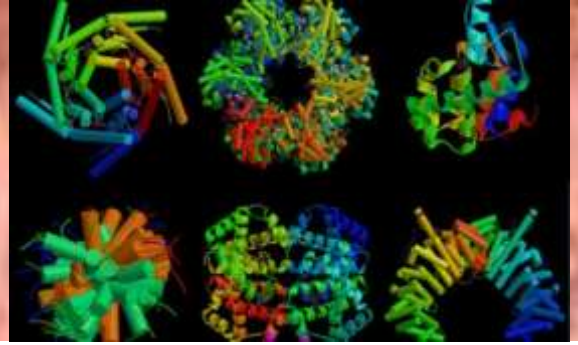
Иерархическая организация зародышевого пути.
Сперматогенный ряд:
Первичная половая клетка -> Гоноцит -> Стволовая сперматогониальная клетка -> Прогениторная (камбиальная) сперматогониальная клетка -> Дифференцирующийся сперматогоний -> Мейоцит -> Сперматида -> Зрелый сперматозоид.

С "птичьего полета" хорошо видно, что сперматогенному процессу свойственны линейность и цикличность, повторяемость и параллельность событий, постоянство связей .

Первым исследователем сперматогенеза был Ла-Валетт-Сент-Жорж.

Им впервые были установлены термины сперматогонии, сперматоциты, сперматиды.





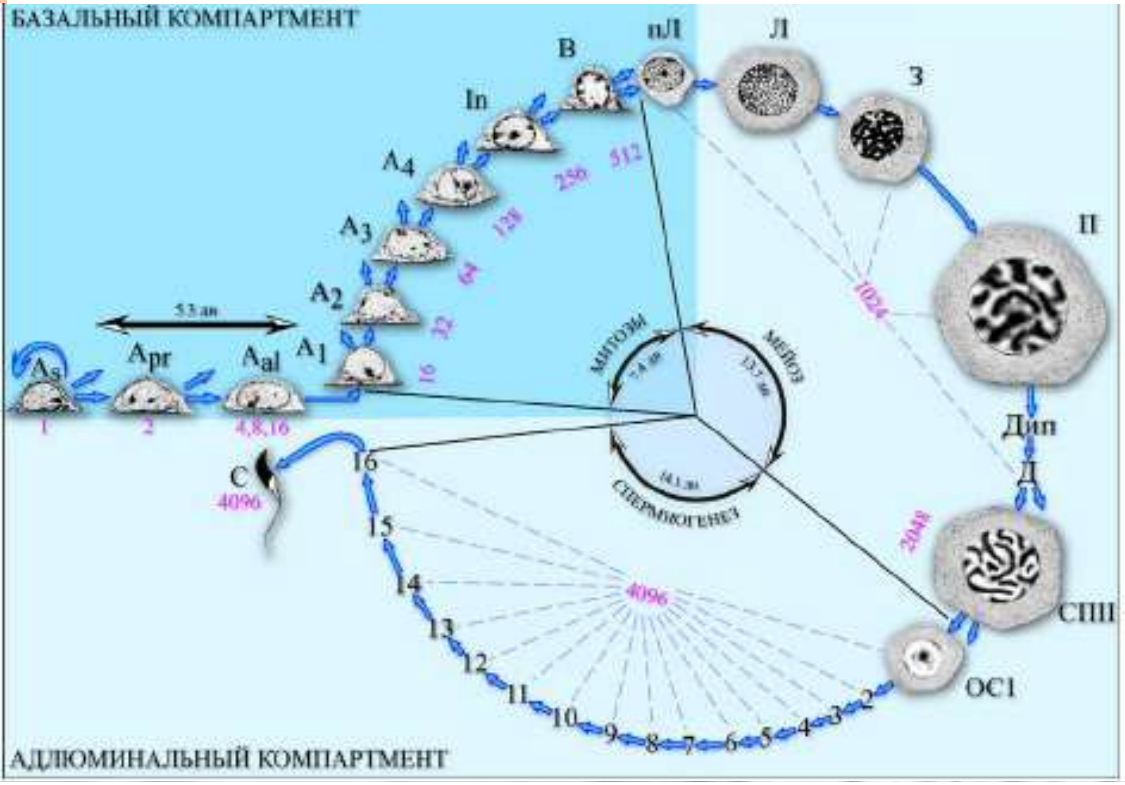
Пространственная организация развития мужских половых клеток больше функциональный, чем формальный критерий, поскольку именно по топологии системы мы судим о степени ее упорядоченности и устойчивости. Пространственное расположение генов, хромосом, биокатализаторов и других каких-то внутриклеточных структур решающим образом определяет синтетические, физико-химические, прочностные свойства любой живой системы.

Поэтому морфогистологические подходы не дискредитированы в науке, но продолжают оставаться удобным и весьма эффективным инструментом для визуализации пространственного порядка (или хаоса) в расположении клеток в сложных тканевых системах, в том числе в структуре сперматогенного эпителия.

Самые глубокие тайны ***сперматогенеза*** не спрятаны где-то глубоко на электронно-микроскопическом или молекулярном уровнях, а открыты для обозрения в очевидных фактах гистологии –науки будущего, науки молодых.

mma.ru
chelovechestvo-p.mirtesen.ru
bluerskitty.blogspot.com

"Дорожная карта" *сперматогенеза* на примере лабораторной мыши

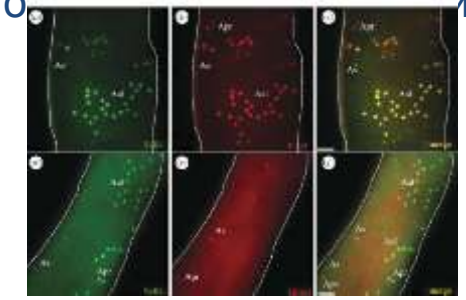


Обозначения: ***As*** – сперматогониальная стволовая клетка (ССК), ***Apr, Aal*** – недифференцированные сперматогонии, ***A1-4, In, B*** – дифференцирующиеся сперматогонии,
пЛ, Л, З, П, Дип, Д – прелептотенные, лептотенные, зиготенные, пахитенные, диплотенные, диакинетические сперматоциты I порядка, ***СПII*** – сперматоцит II порядка,
ОС – округлые сперматиды, 1-16 – стадии созревания сперматид, ***С*** – сперматозоид, 1-4096 – теоретически ожидаемые числа половых клеток, которые могут образовываться из одной, вступившей в дифференцировку ***As*** (по данным ***Meistrich, 1986*** с изменениями).

Базальный компартмент - активная зона размножения, здесь обнаруживается высокая теломеразная активность, выше, чем в других клетках. В ***адлюминальном компартменте*** развиваются мейотические и постмейотические клетки.

Эта принципиальная схема развития мужских половых клеток в своем интегрированном обобщенном виде легко проецируется на ***сперматогенез*** представителей разных групп позвоночных и беспозвоночных, а также на ***сперматогенез*** человека.

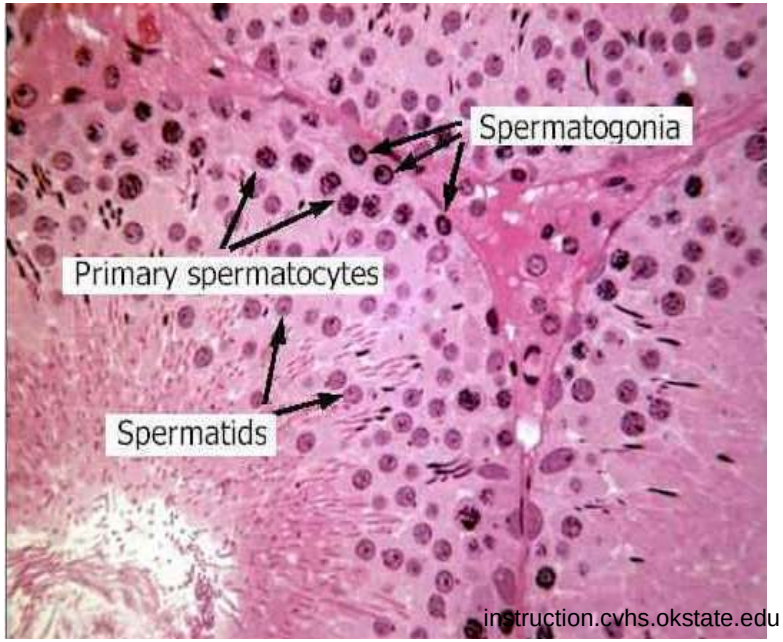
Сперматогенный процесс начинается со стволовой клетки. Которая любит самообновляться и коммитироваться. В гаметогенной номенклатуре стволовые клетки сперматогенного эпителия обозначаются как ***сперматогонии типа As***. Стволовая клетка, поделившись, дает начало ***сперматогониям типа Apr (спаренные)***. Двухклеточная система ***Apr*** (***спаренные)*** переходит к дальнейшим делениям. В результате возникают цепочки, состоящие из 4, затем 8 и 16 клеток. Эти клетки называются ***сперматогониями типа Aal (групповые)***. Все ***сперматогонии типа Apr (спаренные) и Aal (групповые)*** - однотипны, пролиферируют, но не дифференцируются. Они - частично дифференцированы. И, подобно многим прогениторным клеткам, часто берут на себя функции регенеративной системы.



Канальцы с недифференцированными сперматогониями

Phillips B T et al. Phil. Trans. R. Soc. B 2010;365:1663-1678

Период развития ***недифференцированных сперматогониев*** можно назвать прологом сперматогенеза. Формальной же точкой отсчета развития мужских половых клеток, началом количественного роста ***сперматогенной системы*** является момент преобразования ***сперматогониев типа $A_{групповые}$ в сперматогонии типа A_1***. Последующие деления и дифференцировка ***сперматогониев A_1*** ведут к появлению новых клеточных генераций: ***сперматогониев типов $A_2 \rightarrow A_3 \rightarrow A_4 \rightarrow In$ (промежуточный тип) $\rightarrow B$***. Выживание и пролиферация дифференцирующихся ***сперматогониев типа A_1-A_4*** зависят от взаимодействия между рецептором ***c-kit*** - протоонкогенным белком, располагающимся на поверхности мужских половых клеток, и его лигандом – фактором стволовой клетки ***SCF***, продуцируемым ***клетками Сертоли***.



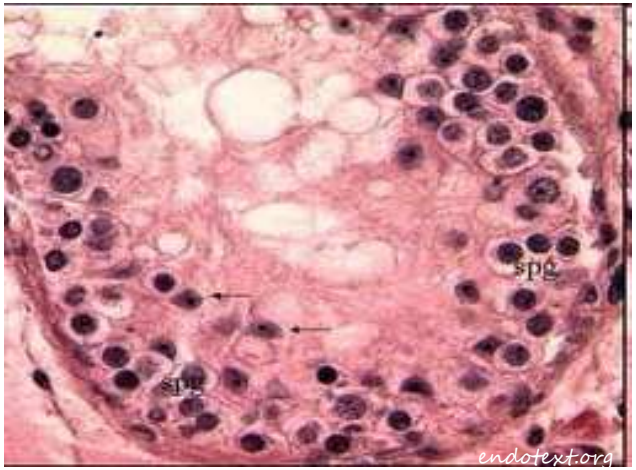
В ряду митозов деление ***сперматогониев типа В*** – последнее. Это деление приводит к образованию качественно новых клеток - ***сперматоцитов I порядка***, вступающих в сложную профазу I мейоза. На этой ключевой стадии развития мужских половых клеток разворачиваются процессы, связанные с уникальными преобразованиями ядерного и внутриклеточного материалов.

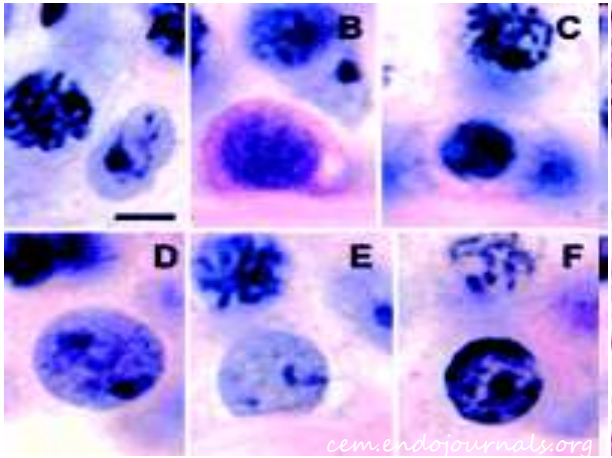
После двух мейотических делений каждый диплоидный по хромосомному набору и тетраплоидный по содержанию ДНК ***сперматоцит I порядка*** дает начало четырем фенотипически одинаковым, но генетически различным гаплоидным ***сперматидам***.

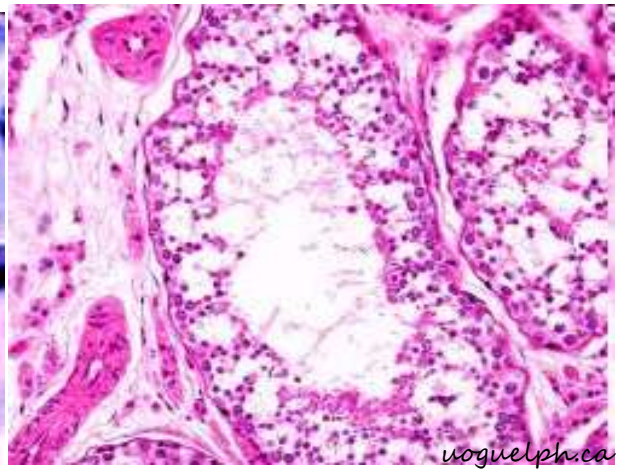
Сперматиды прежде чем превратиться в ***спермии*** проходят через ряд этапов созревания. Этот процесс называется ***спермиогенезом***. В спермиогенезе тоже происходят необычные структурные и биохимические изменения, приводящие к существенным упрощениям мужских половых клеток.

С точки зрения термодинамического формализма ***сперматогенез*** – процесс не совсем идеальный. Он сопровождается огромными энтропийными потерями.

КПД паровых машин, как мы знаем, составляет 35-37%, в семенниках потери клеток достигают 60 -65%. Гибель клеток чаще всего происходит на стадиях размножения сперматогониев и мейоза. У старых мужчин, но не у молодых, приблизительно 40% ***прелептотенных/лептотенных сперматоцитов*** дегенерирует, прежде чем станут ***пахитенными сперматоцитами***. По другим данным, 30-40% сперматоцитов на стадиях ***пахитены и диплотены*** гибнут во время собственно мейотических делений.





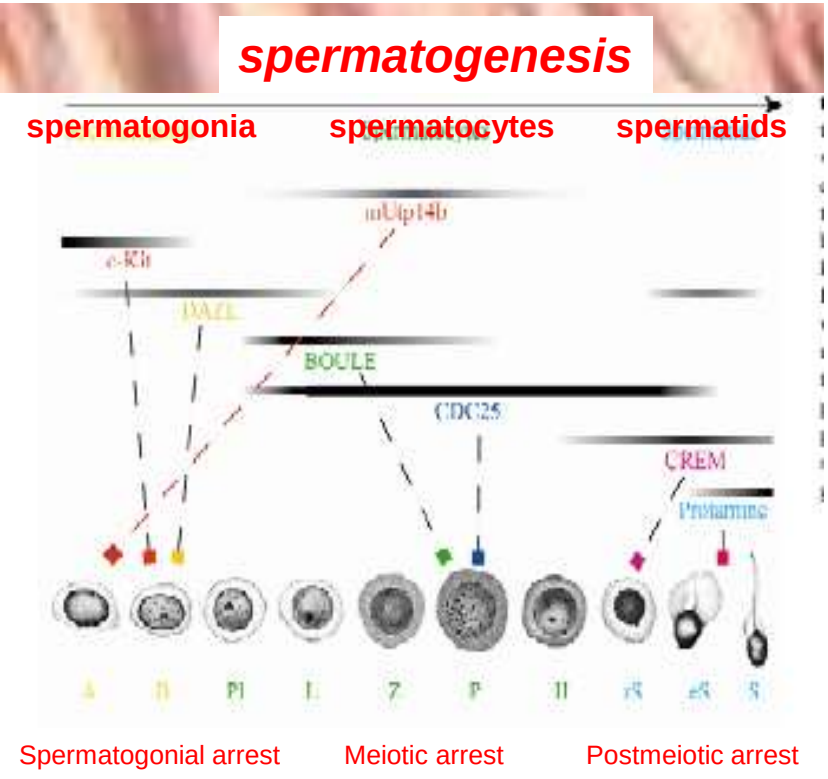


Как бы там ни было, но у человека с каждым биением сердца формируются более 1000 сперматозоидов.

В настоящее время существуют две точки зрения на явление катастрофической потери клеток во время ***сперматогенного процесса***. С одной стороны, предполагается, что клеточная дегенерация – это механизм, с помощью которого элиминируются клетки с тяжелыми хромосомными аномалиями. С другой стороны, допускается, что, поскольку величина дегенерации в каждом конкретном случае величина относительно постоянная, гибель клеток может быть связана с их перепроизводством. А избыточность, как известно, исключает возможность устойчивого развития. Хорошо известно, что, например, в ядерных реакторах, чтобы они не пошли в разнос, "лишние" быстрые нейтроны, возникающие в результате разветвленных цепных ядерных реакций, поглощаются веществами-замедлителями, в частности, графитными стержнями. В семенниках роль таких своеобразных графитных стержней выполняют ***клетки Сертоли***, фагоцитирующие «лишние» клетки. Обе гипотезы друг другу не противоречат и, скорее всего, обе являются верными, поскольку отсеивание худшего и избыточного в норме способствует сохранению высокой упорядоченности системы.

Однако важно добавить, что при сильной мутагенной нагрузке элиминационный аппарат не в состоянии оценить огромный потенциал мутаций, возникающих в *мужских половых клетках*. Многие точечные, генные мутации ускользают от репарационного контроля. Мутантные клетки часто демонстрируют высокую жизнеспособность и способность конкурировать с нормальными геномами за точки оплодотворения.

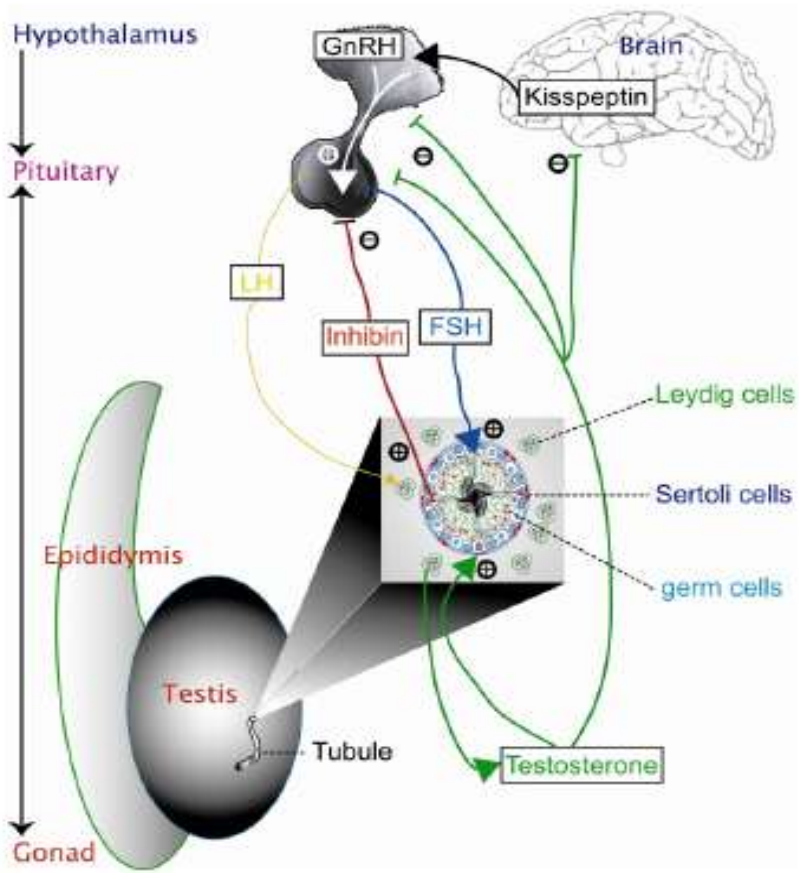
Expression pattern of seven genes related to spermatogenesis.



Disruption of the gene function results in spermatogenic arrest at different levels of spermatogenesis. This model depicts the 10 different steps of spermatogenesis and associates them with the protein expression of ***jsd***, ***c-kit***, ***Dazl***, ***boule***, ***cdc25***, ***CREM*** and ***protamine***. Lack of ***jsd***, ***c-kit*** and ***Dazl*** result in a spermatogonial arrest, ***Boule*** and ***cdc25-*** deficiency leads to a meiotic halt while missing ***CREM*** and ***protamine*** expression arrests spermatogenesis postmeiotically. Abbreviations: ***Spermatogonia A*** (A), ***spermatogonia B*** (B), ***preleptotene*** (Pl), ***leptotene*** (L), ***zygotene*** (Z), ***pachytene*** (P), ***secondary spermatocyte*** (II), ***round spermatids*** (rS), ***elongating spermatids*** (eS), ***elongated spermatids*** (S).

J. Wistuba et al. Mammalian Spermatogenesis
Functional Development and Embryology ©2007 Global Science Books

Endocrine regulation of male functions along the hypothalamic-pituitary-gonadal axis.



***kisspeptin** is secreted from the brain and stimulates the release of **gonadotropin-releasing hormone** (**GnRH**), secreted from the hypothalamus, which induces the release of both gonadotropins, **luteinizing hormone** (**LH**), and **follicle-stimulating hormone** (**FSH**) from the pituitary. **LH** stimulates the **Leydig cells** of the testes to produce and release **testosterone**, whereas **FSH** stimulates **Sertoli cells** of the testes to support the germ cells to undergo spermatogenesis. Serum **testosterone** and **inhibin** down regulate the production of **kisspeptin**, **GnRH** and both gonadotropins in a negative feedback loop.*

J. Wistuba et al. Mammalian Spermatogenesis
Functional Development and Embryology ©2007 Global Science Books

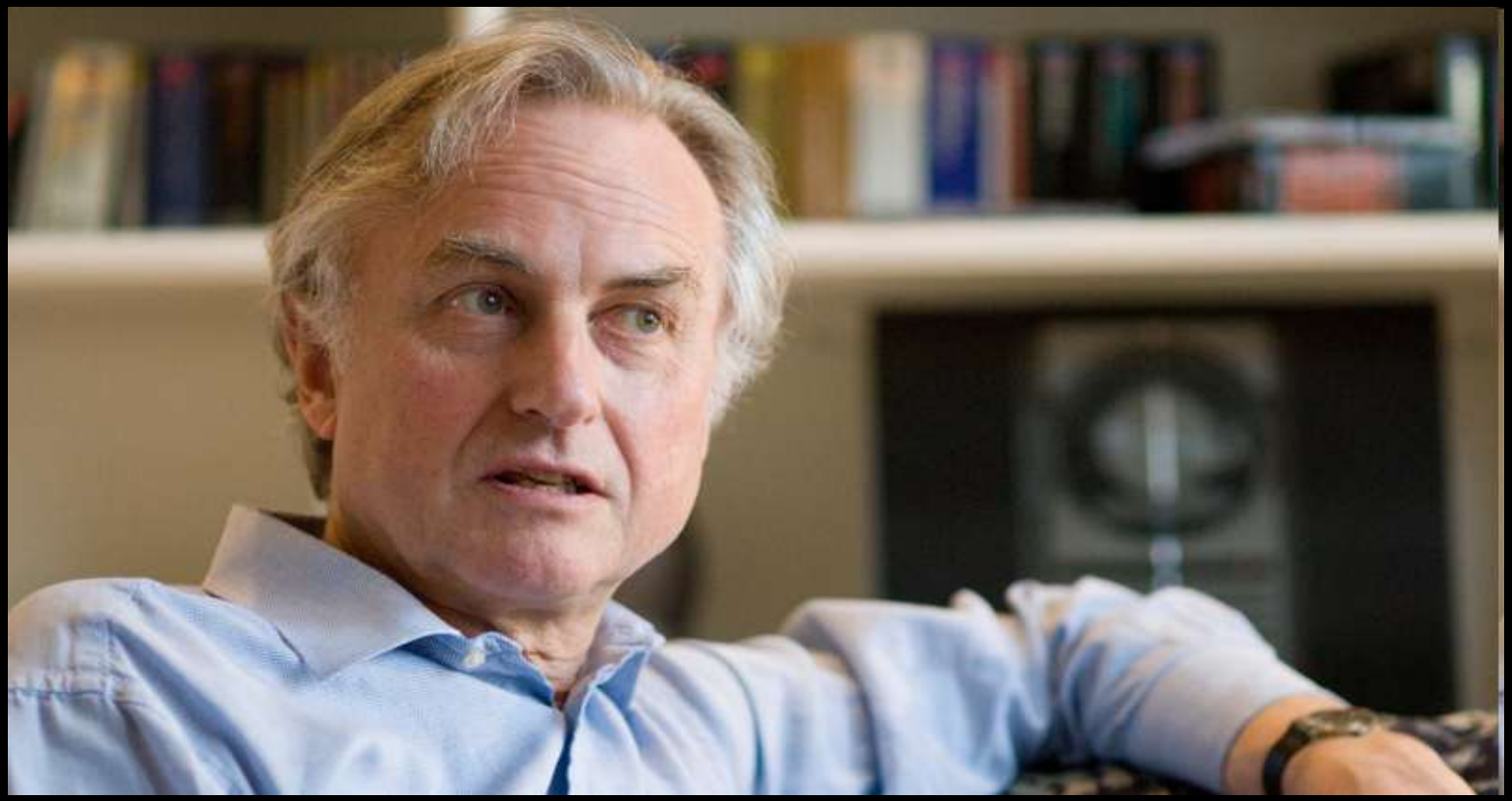
Сперматогониальные и все последующие клеточные генерации вплоть до стадии сперматозоидов развиваются как синцитиальные клоны.

Факт синцитиального развития клеточных популяций имеет важное общесистемное значение. Синцитий - это не простая сумма клеток, но развернутый порядок клеточной кооперации, обеспечивающий коммуникационное равновесие. В отличие от ***ССК****, имеющих больше возможностей перемещаться в пространстве, клеточные «индивидуальности» в синцитии, будучи жестко скреплены межклеточными мостиками, лишены свободы перемещения. Связь между клетками здесь осуществляют мириады химических молекул, которые уже не являются «частной собственностью» той или иной отдельной клетки, а находятся во власти всех клеток, организованных в «сверхклетку».*

Клеточная глобализация создает единое информационное пространство, в котором все продукты экспрессии генов - рибонуклеиновые кислоты, белки, ферменты - распределяются равномерно между клетками.

*Такая возможность была доказана экспериментально американскими исследователями **Брауном и Бринстером** на примере трансгенных гемизиготных мышах. В геном этих животных интегрировали химерный ген, состоящий из регуляторных последовательностей, кодирующих одну из фракций спермиоспецифических, протаминоподобных белков **MP1** и структурного гена гормона роста человека. Причем конструкт был представлен только в одной из двух гомологичных хромосом. Естественно, после мейотических делений только половина образовавшихся сперматид несла трансген. Однако продукты трансгена - **РНК** и **белки** - равномерно распределялись между всеми сперматидами и сперматозоидами. Точнее говоря, они были обнаружены в 89-90% случаев.*

***Реди и его коллеги** увидели аналогичную картину на модели анеуплоидии по 16 хромосоме. Эта хромосома несет гены, ответственные за синтез протаминоподобных белков. Так вот анеуплоидия по 16 хромосоме не вызывала нарушений в содержании этих белков, образовании дисульфидных мостиков в хроматине всех зрелых сперматозоидов. Как показали итальянские исследователи, эуплоидные и анеуплоидные гаметы не отличались друг от друга по молекулярной организации.*



Весьма интересна гипотеза известного английского ученого ***Р.Докинза***, согласно которой необходимость распределения белковых продуктов (также как и выключения генома ***мужских гамет***) связана с генетической неоднородностью ***постмейотических клеток***, и призвана минимизировать генетически обусловленные различия между сперматозоидами, поскольку мутации, приводящие к большей жизнеспособности гамет, в дальнейшем могут оказаться вредными для организмов.

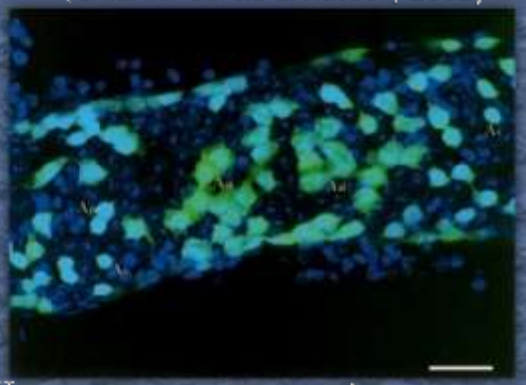
Синцитиальное развитие мужских половых клеток

по Ren & Russell, 1991
с изменениями

A_s
A_{pr}
A_{al}
A_1
A_2
A_3
A_4
In
B
Сперматоциты I порядка
Сперматоциты II порядка
Сперматиды

1
2
4
8
16
16
32
64
128
256
512
1024
2048
4096

Сперматогонии типа A_4
(Chiarini-Garcia & Russell, 2002)



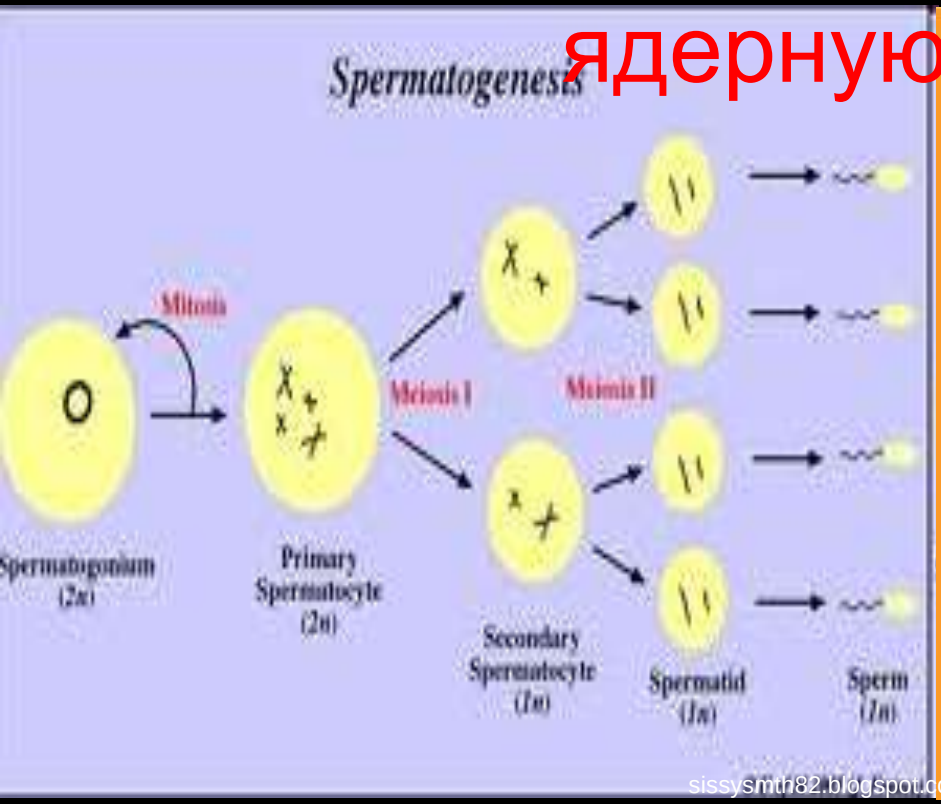
Цепочки сперматогониев A_{al} донора в канальце реципиента (Ogawa *et al.*, 2002)

Цепочки сперматогониев A_{al} донора в канальце реципиента (Nagano *et al.*, 1999)

В результате синцитиального объединения половые клетки попадают в один темпомир, имеют свое независимое внутреннее время, "живут" и развиваются с одной и той же скоростью. Синцитий – пример биологической самоорганизации, перехода системы от хаотического состояния к функциональной упорядоченности, приводящей к экономии расходов вещества и энергии.

Словом, объединение клеток в «сверхклетку», т.е. комплекс надындивидуального порядка диктуется энергетической целесообразностью.

Легко видеть, что деления сперматогенных клеток чем-то напоминают разветвленную цепную ядерную реакцию



sissysmth82.blogspot.com

crazymama.ru

Непременным условием возникновения цепной сперматогенной реакции является наличие пула ***ССК***, размножающихся ***сперматогониев***. По аналогии с размножением нейтронов, коэффициентом размножения сперматогониев можно назвать отношение числа сперматогониев, возникших в некотором звене реакции, к числу таких же сперматогониев в предшествующем звене.

Развитие цепной сперматогониальной реакции требует $K \geq 1$, где k – коэффициент размножения:

$$(k \geq A_2/A_1,\ A_3/A_2,\ A_4/A_3,\ In/A_4,\ B/In).$$

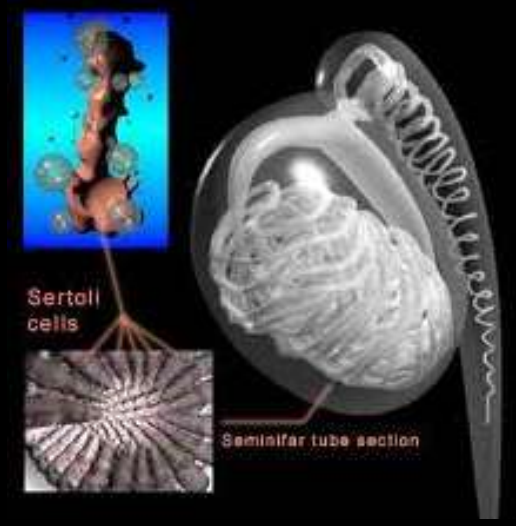
Величина k определяется многими вероятностями: балансом процессов пролиферации и апоптоза, критической массой ***ССК***, ***ростовыми факторами***, синтезируемыми ***клетками Сертоли***. Если n – число сперматогониев в каком-то звене сперматогенной реакции, то в следующем звене сперматогониев будет $n \cdot k$. Прирост dn числа сперматогониев за одно «поколение» (деление) равен:

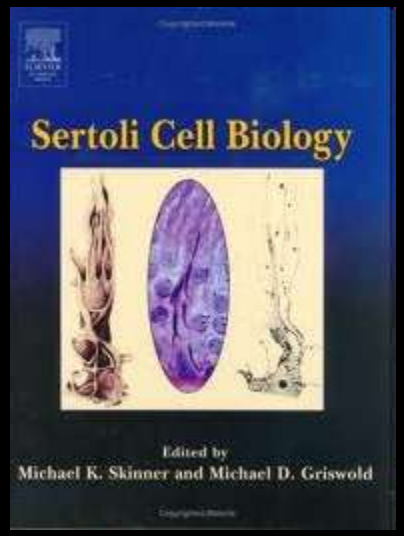
$$dn = kn - n = n(k-1).$$

При $k > 1$, n растет с течением времени и цепная реакция называется ускоряющейся (развивающейся). При $k - 1 = 0$, т.е. $k = 1$, $n = n_0$, число сперматогониев не изменяется с течением времени, и реакция называется самоподдерживающейся (условие $k = 1$ определяет критический режим реакции;

при $k < 1$ режим называется подкритичным, а при $k > 1$ – надкритичным). Если число сперматогониев n меньше числа сперматогониев n_0, то процесс размножения можно считать затухающим.

Управлять сперматогенезом – это воздействовать на его процессы, связанные с пулом ***ССК*** и ***цепной сперматогониальной реакцией***.





Клетки Сертоли - единственный тип соматических клеток, присутствующих в семенных канальцах. Они интегрированы в сперматогенную систему, образуют с ней единое структурно-функциональное целое.

И хотя **клетки Сертоли** свободны от функции образования потомства, их роль в регуляции процессами сперматогенеза – ведущая. Они участвуют в гормональной регуляции сперматогенеза, в фагоцитозе дегенерирующих и стареющих половых клеток, спермиации, выполняют опорные и трофические функции. Сложные плотные контакты, формирующиеся между ***клетками Сертоли***, разделяют семенные канальцы на базальный и адлюминальный компартменты.

Показано, что нарушения структуры каналов в зоне межклеточных контактов вследствие мутации гена *коннексина* возникает “глухота” клеток к регулирующим сигналам. У нокаутированных по этому гену мышей блокируется дифференцировка ***клеток Сертоли***, но поддерживается их пролиферация.

Клетки Сертоли предотвращают нарастание числа половых клеток и поддерживают сперматогенную систему в необходимом стационарном состоянии.

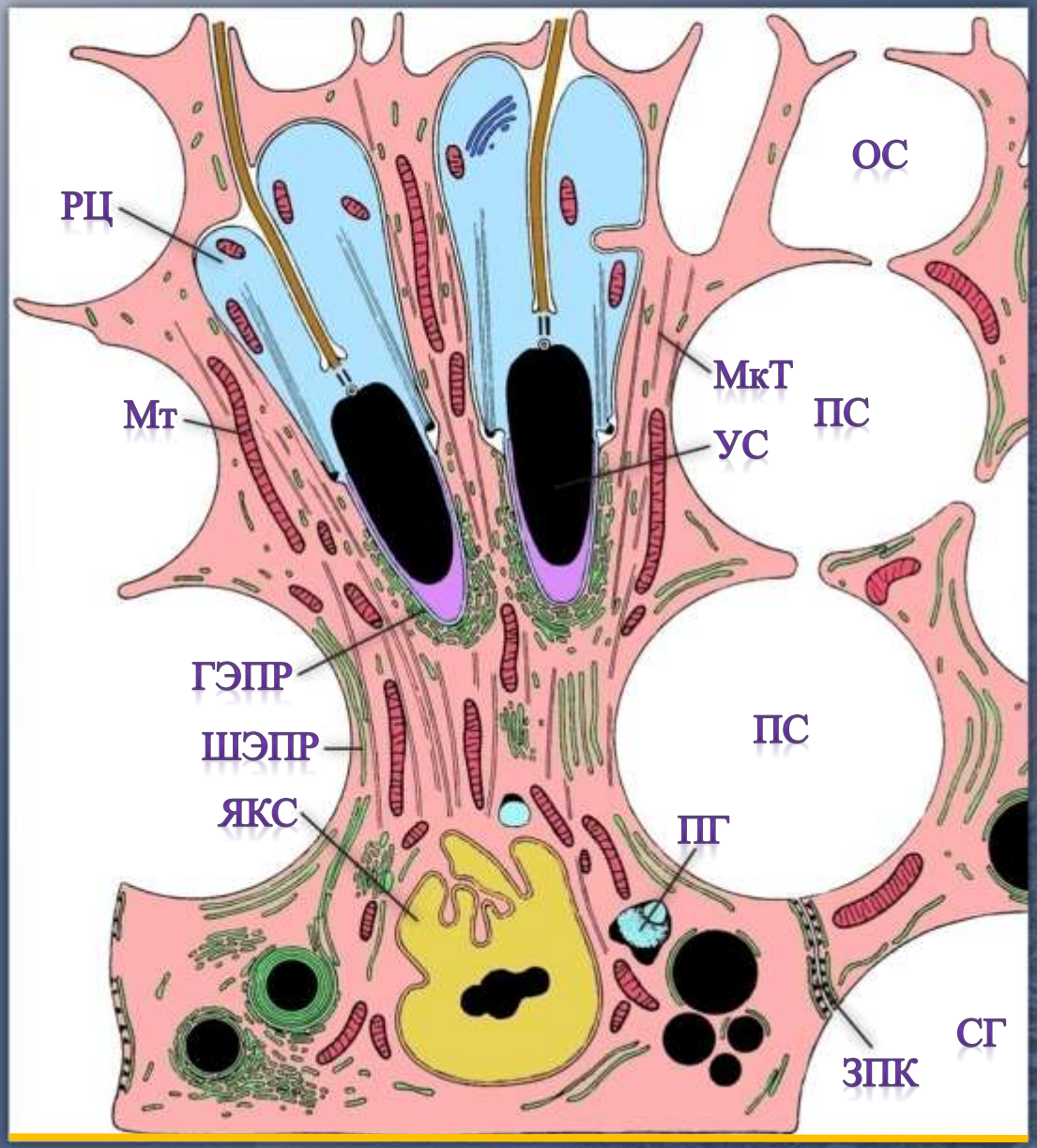
В семенных канальцах клетки Сертоли равномерно распределяются среди половых клеток, они тянутся от базальной мембраны через всю толщу сперматогенного эпителия. Каждая клетка Сертоли обслуживает определенное число развивающихся мужских половых клеток, а какое это число точно определить трудно. Правда, это не касается удлиняющихся сперматид, которые просто залиты в апикальный конец клеток Сертоли.

Определено, что отношение удлиняющихся сперматид к клеткам Сертоли есть главный показатель, определяющий ежедневную продукцию сперматозоидов.

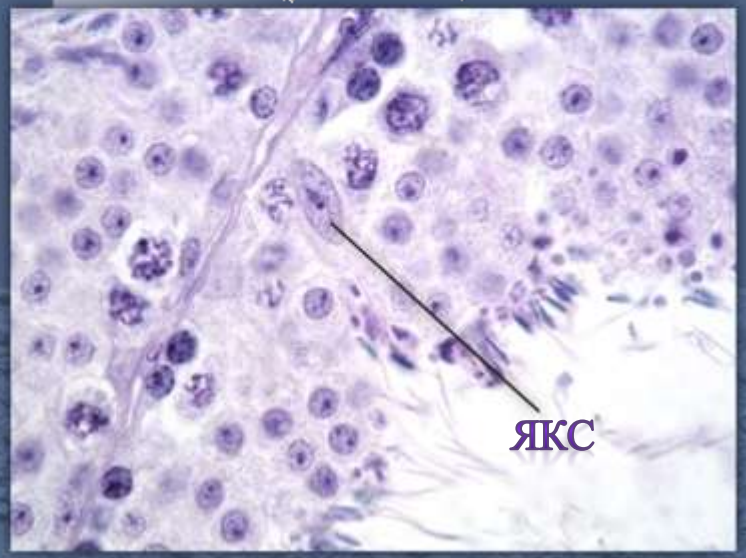
Отношение удлиняющихся сперматид : клетки Сертоли варьирует от 9.75 у полевки до 12.17 у кролика. У обезьян это значение ещё ниже – 5.94.

Клетка Сертоли

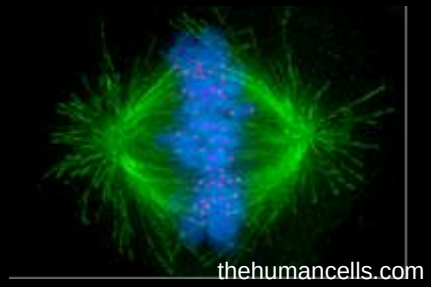
Структура клетки Сертоли (по Fawsett, 1975, с изменениями)

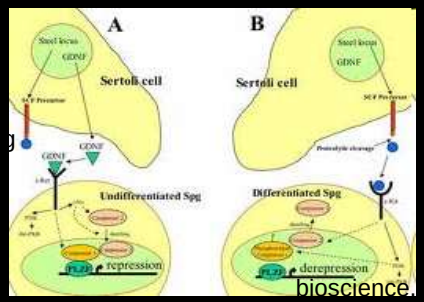


Срез семенного канальца мыши (ув. об. ×40)



ГЭПР – гладкий эндоплазматический ретикулум,
МкТ – микротрубочка,
Мт – митохондрия,
ОС – округлая сперматида,
ПГ – пигментная гранула,
ПС – сперматоцит на стадии пахитены,
РЦ – ризидуальная цитоплазма сперматид,
СГ – сперматогония,
УС – удлиняющаяся сперматида,
ШЭПР – шероховатый эндоплазматический ретикулум,
ЯКС – ядро клетки Сертоли.



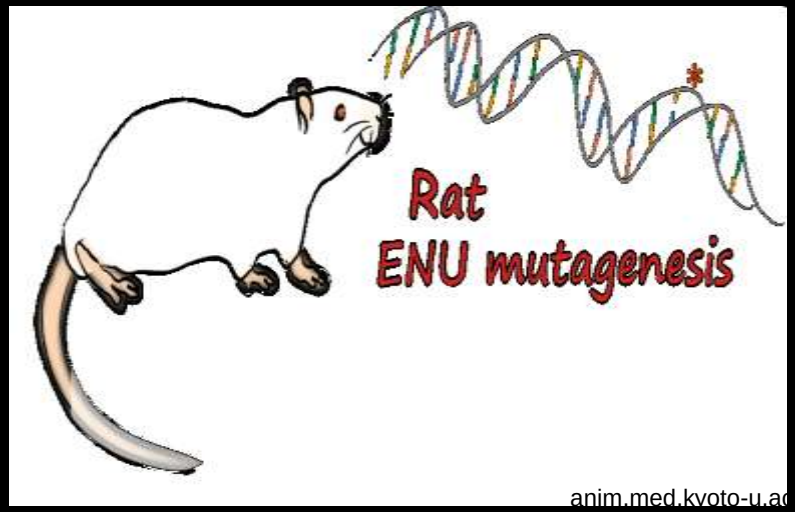


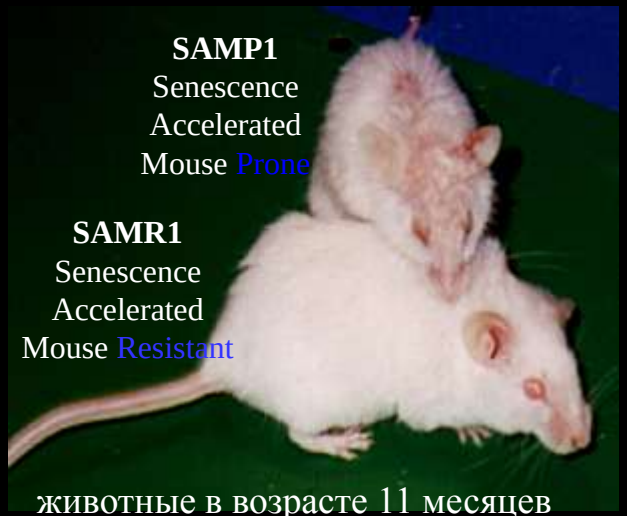
В семенниках половозрелых млекопитающих ***клетки Сертоли*** теряют способность к пролиферации.

У мышей и крыс митотические деления ***клеток Сертоли*** практически полностью завершаются через 2-3 недели после рождения.

Правда, у человека и других приматов - ***клетки Сертоли*** сохраняют митотическую активность на протяжении многих месяцев или даже лет после рождения. У взрослых организмов популяция ***клеток Сертоли*** представляет собой стабильную высокодифференцированную клеточную систему.

Клетки Сертоли обладают повышенной устойчивостью к повреждениям.





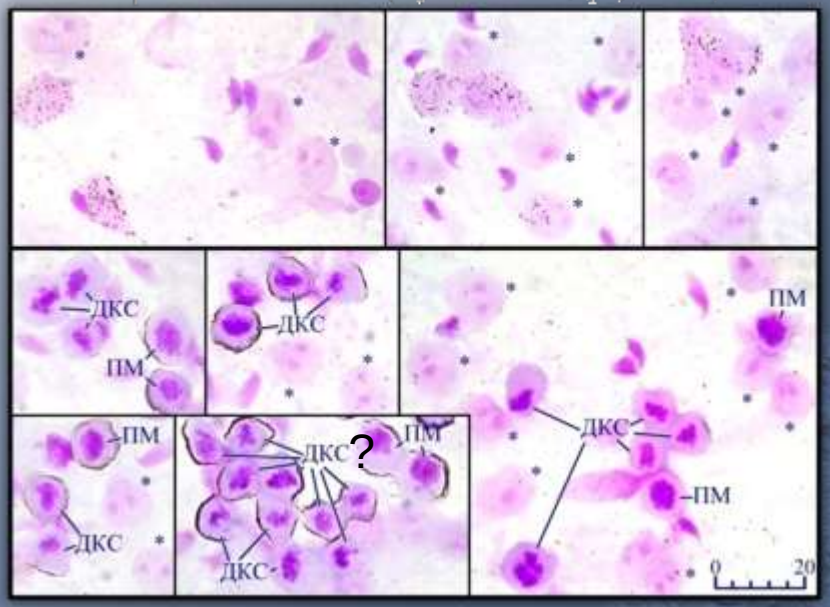
животные в возрасте 11 месяцев

И тем не менее.

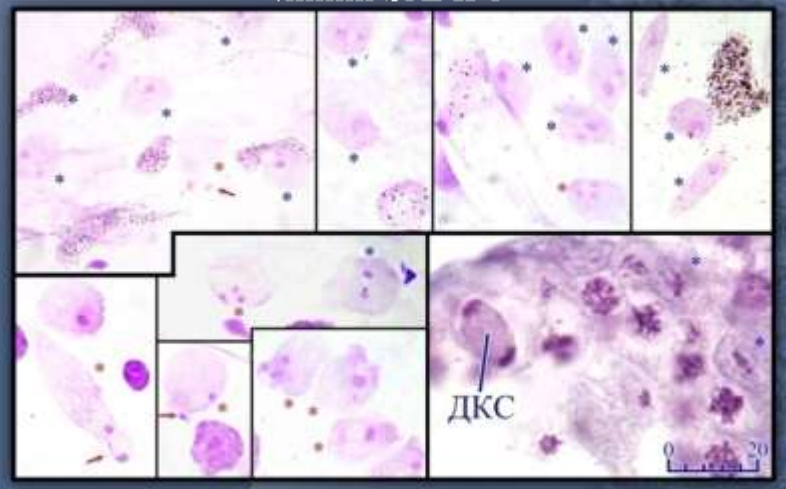
Возможность пролиферации *клеток Сертоли* в семенниках взрослых, половозрелых грызунов была показана нами с помощью индуцированного химического мутагенеза и на биологической модели ускоренно стареющих мышей, страдающих наследственной формой вирусной лейкемии.

Деление клеток Сертоли (КС) взрослых мышей после мутагенного воздействия

Пролиферация КС у подопытных мышей-гибридов F_1 CBA×C57/Bl6 (Кулибиш и др., 2008)

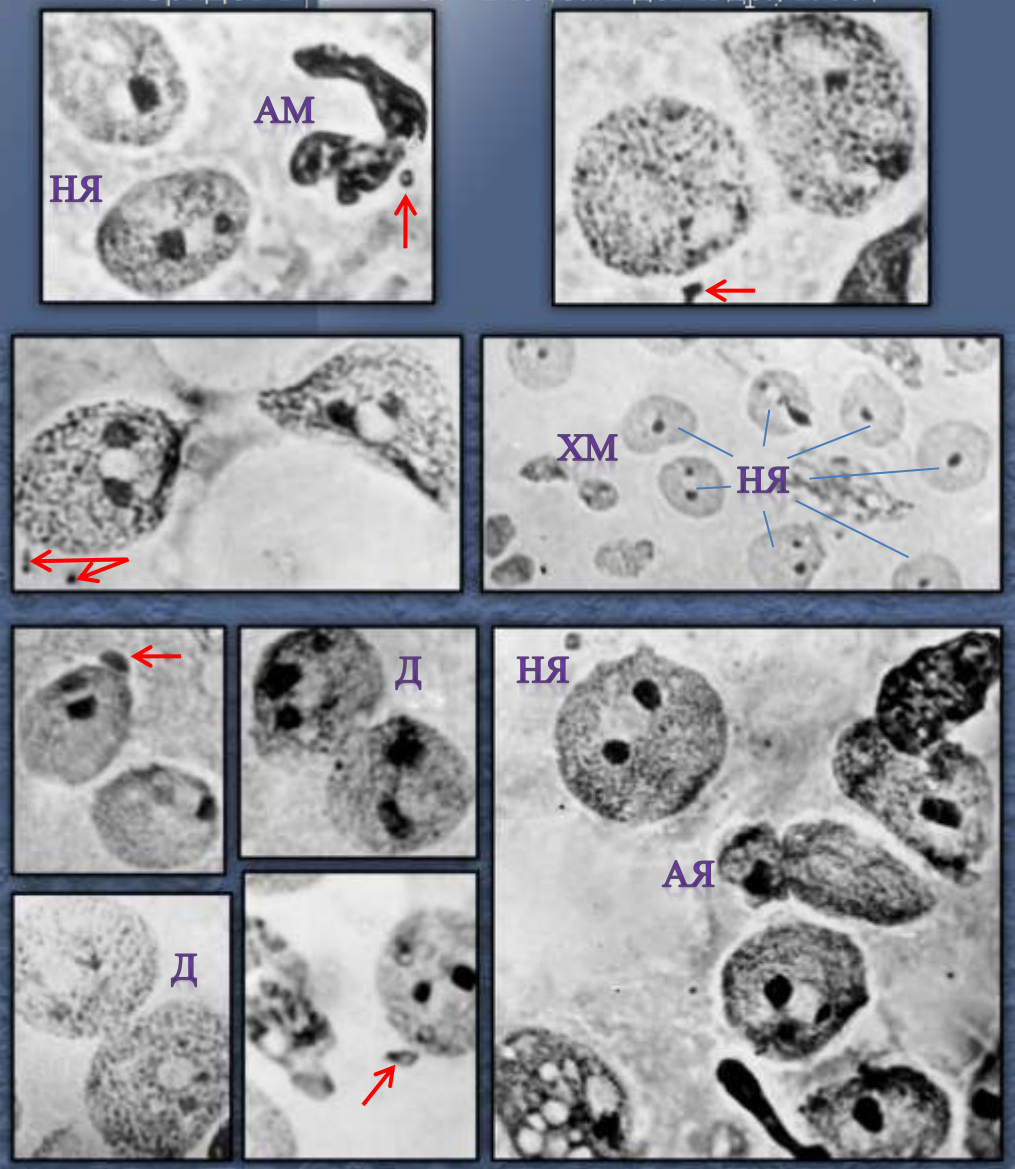


Пролиферация КС у подопытных мышей линии SAMP1



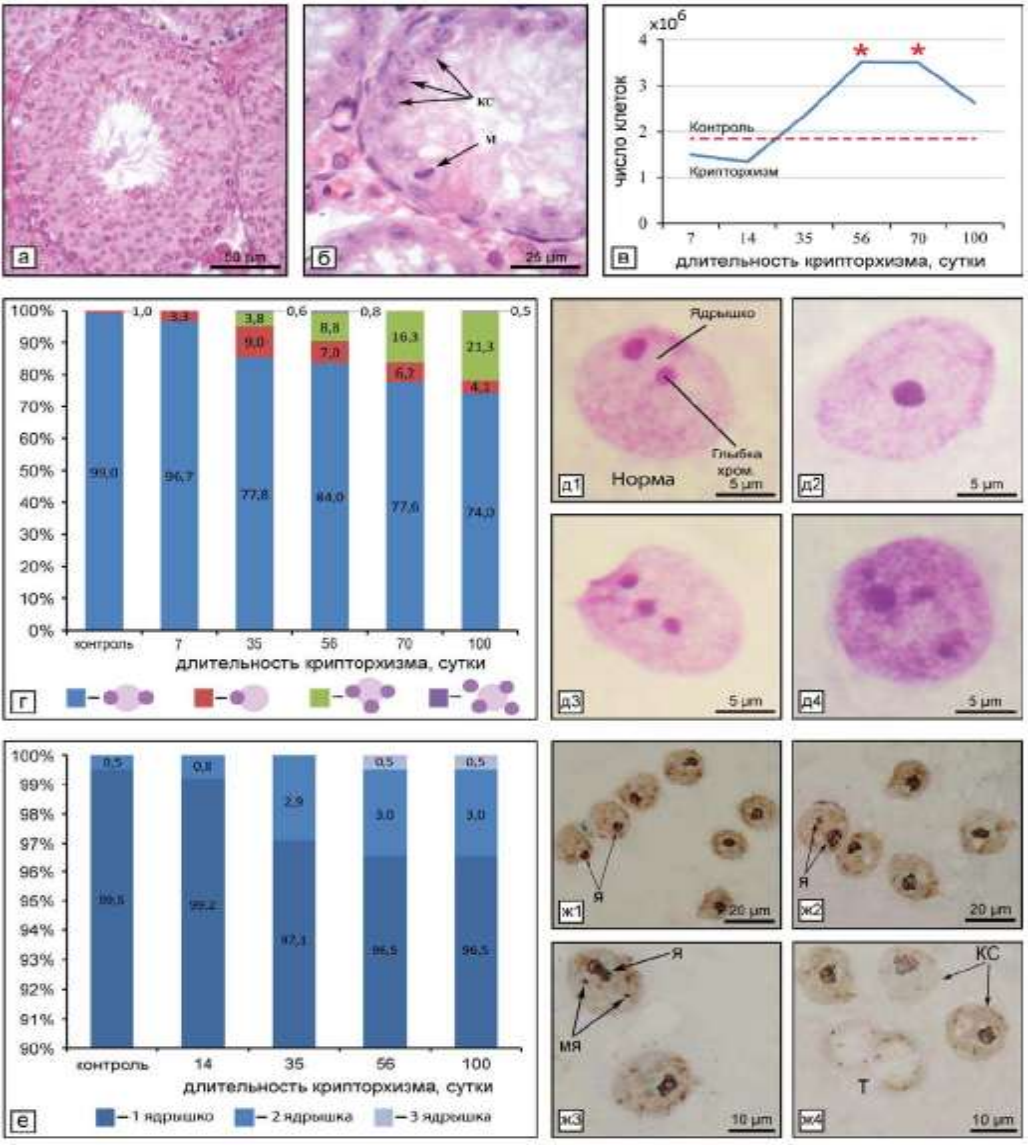
ДКС – деление КС, ПМ – прометофазное ядро КС, * - ядра КС с нормальной и * - аномальной морфологией, → – выпадающие хроматиновые глыбки.

Окрашенные по Фельгену ядра КС подопытных мышей-гибридов F_1CBA×C57/Bl6 (Захидов и др., 1995)



АМ – аномальный митоз, АЯ – аномальное ядро клетки Сертоли, Д – двуядерные клетки, НЯ – ядро нормальной морфологии, ХМ – хромосомный мост. Стрелки – микроядра.

Клетки Сертоли (КС) у взрослых мышей после проведения операции билатерального крипторхизма.



Результаты изучения ***клеток Сертоли*** (***КС***) взрослых мышей после проведения операции билатерального крипторхизма.

а, б – поперечные срезы семенных канальцев интактного семенника (контроль) и крипторхидного семенника (35 сут крипторхизма) соответственно (окраска гематоксилин-эозин),

в – график изменения числа интерфазных ***КС*** у крипторхидных мышей по сравнению с контролем (* – различия статистически значимы при $p \leq 0.05$),

г – относительное содержание ядер ***КС*** с нетипичной организацией околоядрышкового гетерохроматина на различные сроки крипторхизма,

д1–4 – примеры организации околоядрышкового гетерохроматина ***КС*** в норме и опыте (окраска по Фельгену),

е – соотношение числа ***КС*** с различным числом ядрышек у контрольных и крипторхидных мышей,

ж1–4 – ***КС*** на отпечатках семенника, окрашенные нитратом серебра. Обозначения: ***КС*** – ***клетки Сертоли***, ***М*** – ***клетка Сертоли*** на стадии метафазы, ***Я*** – ядрышко, ***МЯ*** – микроядрышки, ***Т*** – ***клетка Сертоли*** на стадии телофазы.

По материалам работы О.М.Челомбитько, Т.Л.Маршак, С.Т.Захидова, 2008 г.

О чем говорят наши наблюдения.

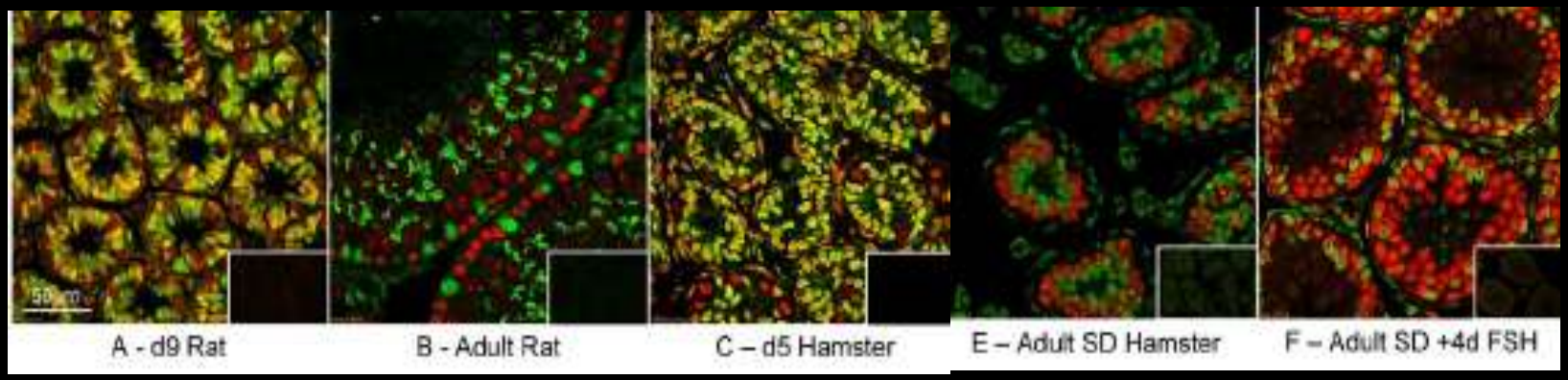
Во-первых, они свидетельствуют в пользу того факта, что во многих случаях самые сложные, фундаментальные вопросы в естествознании решаются простыми экспериментами, задолго до раскрытия их тонких механизмов.

Во-вторых, они подтверждают положение о том, что необратимое блокирование размножения случай довольно-таки редкий.

В свое время ***И.А.Рапопорт*** писал, что*….«только в нервной системе блокирование необходимо. Если бы нейроны делились - это нарушало бы архитектонику нервной системы, которая играет важную роль в отображении окружающего мира. Новые клетки были бы лишены той информации, которая зафиксирована в старых клетках. Разбавление новыми клетками создавало бы помехи и существенные затруднения в регистрации информационных и подаче исполнительных сигналов. Передача информации не улучшилась бы и в том случае, если бы она дублировалась после деления нервной клетки».*

Результаты наших наблюдений нашли подтверждение в экспериментальных иммуноцитохимических исследованиях.

FSH induces Sertoli cell proliferation in the adult Djungarian hamster



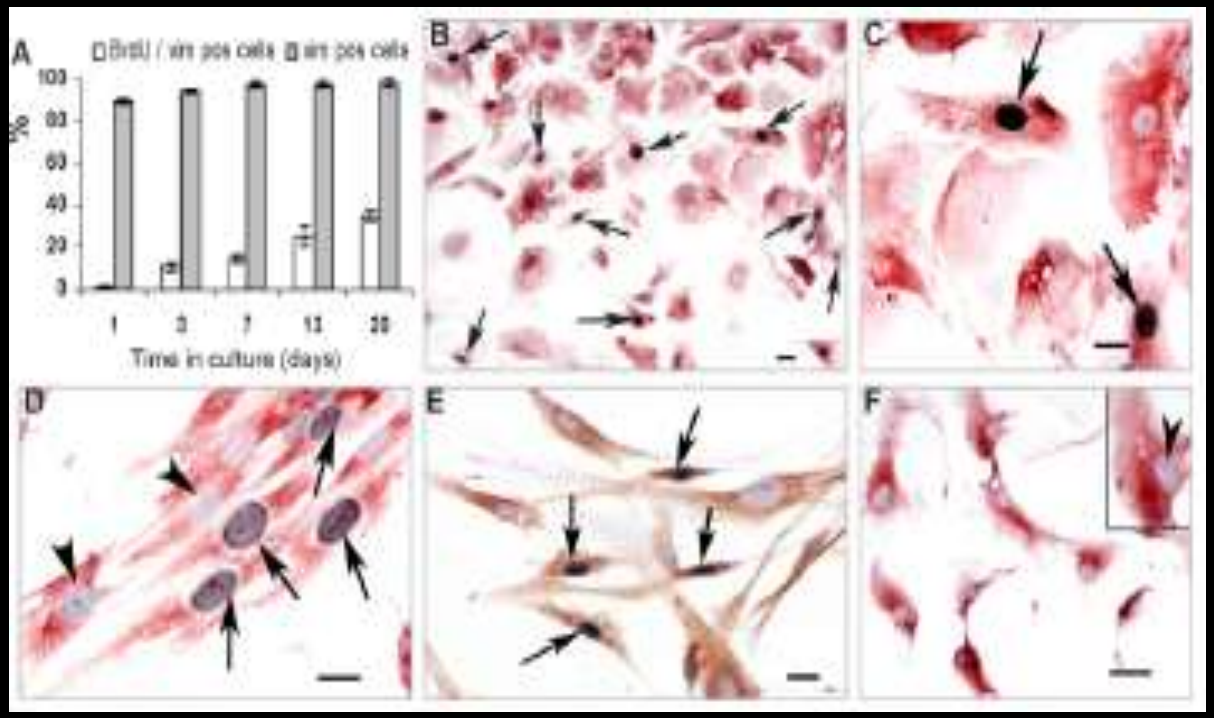
These micrographs illustrate the reactivity of a proliferation marker (PCNA; red) and ***Sertoli cell*** nuclear marker (GATA4; green) in testis sections, as assessed by confocal immunofluorescence, with coexpression appearing yellow. The immature (day 9) rat (A) served as a positive control, because ***Sertoli cells*** are known to proliferate at this time. However, the adult rat (B) served as a negative control at this time, when ***Sertoli cells*** are known not to be proliferating. Immature hamster ***Sertoli cells*** expressed PCNA (C), but only isolated, low-level reactivity was observable in the adult SD(E) hamster testis. Intense ***Sertoli cell*** PCNA reactivity was observed in the SD hamster testis treated with FSH for 4 days (F). Boxes are controls in which the primary antibody was substituted with an equivalent concentration of a nonspecific antibody from the same species.

FSH – фолликулостимулирующий гормон.

SD- short-day photoperiod (8L:16D).

G.A.Tarulli et al., 2006, BIOLOGYOF REPRODUCTION 74, 798–806

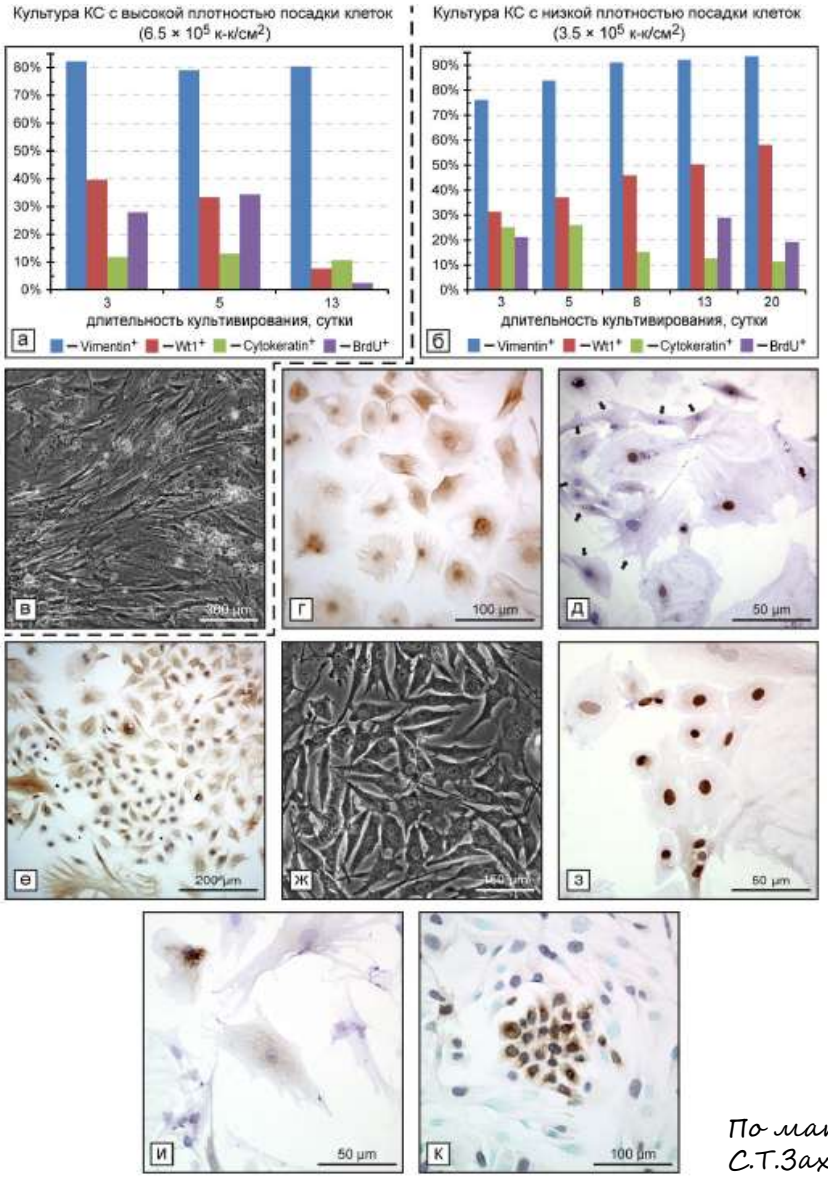
Sertoli cells are able to proliferate in vitro.



A) The percentages of cells in culture that are positive for the ***Sertoli cell*** marker vimentin and the percentages of mouse ***Sertoli cells*** that experiments. vim, vimentin; pos, positive. B–D) Adult mouse ***Sertoli cells*** that were positive for BrdU after 6 days (Band C) and16 days (D) in culture. Red indicates vimentin-positive cells; dark blue, BrdU-positive cells (arrows). Arrowheads indicate BrdU-negative ***Sertoli cells***. E) Adult human ***Sertoli cells*** isolated from a biopsy specimen and cultured for several weeks. F) Several ***Sertoli cells*** were positive for vimentin (red) and BrdU (dark blue) (arrowhead). The inset shows vimentin-positive mouse ***Sertoli cells*** with large nuclei and three nucleoli (arrowhead) in a 4-day culture. (*E. A. Ahmed et al., BIOLOGY OF REPRODUCTION 80, 1084–1091, 2009*).

Справедливости ради, однако, отметим, что ещё в 1977 году Marino et. al. показали, что клетки Сертоли в культуре ткани половозрелого кролика в первые дни культивирования ***раз-мно-жа-лись*** *(!).*

Результаты иммуноцитохимического исследования культуры клеток Сертоли (КС) взрослых мышей.



а, б – динамика изменения числа клеток, экспрессирующих маркеры КС (vimentin, Wt1, cytokeratin), а также включающих BrdU, в процентах от общего числа клеток в культуре;

в – зарастание культуры ***КС*** фибробластоподобными клетками на 13 сут культивирования (фазовый контраст);

г – колония vimentin+-***КС*** на 20 сут культивирования (коричневая цитоплазма);

д – колония ***КС*** на 8 сут культивирования, состоящая как из Wt1+-клеток (коричневые ядра), так и из Wt1–-клеток (черные стрелки) (докрашено гематоксилином);

е – колония ***КС*** на 13 сут культивирования, содержащая Vimentin+/BrdU+-клетки (коричневая цитоплазма, серые ядра);

ж – колония ***КС*** на 20 сут культивирования (фазовый контраст);

з – колония Wt1+-***КС*** на 8 сут культивирования (докрашено гематоксилином);

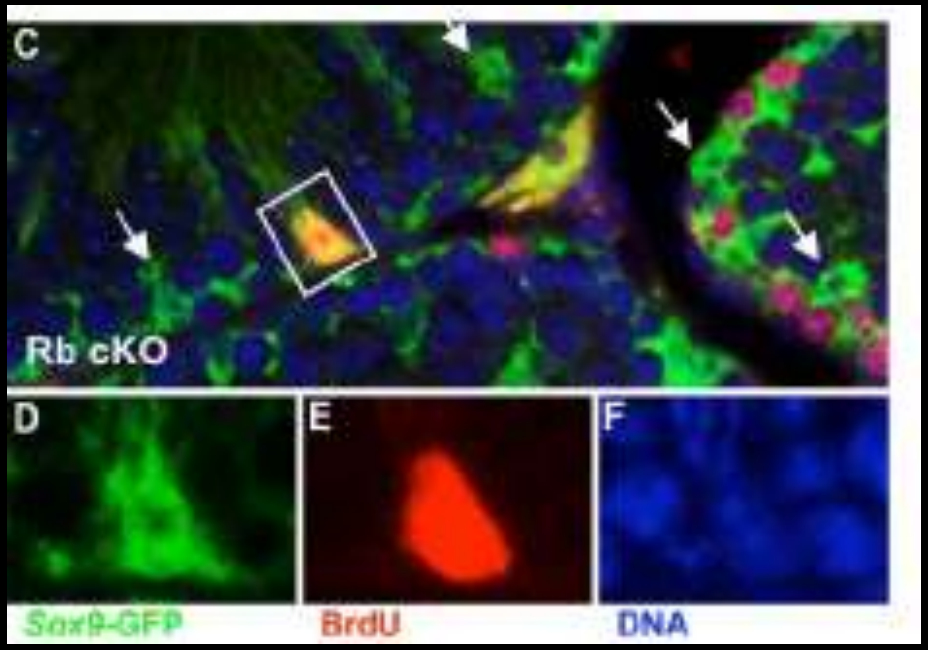
и – Cytokeratin+-КС на 3 сут культивирования (коричневая цитоплазма) (докрашено гематоксилином);

к – колония Cytokeratin+/BrdU+-**КС** на 3 сут культивирования (коричневая цитоплазма, серые ядра) (докрашено метиленовым зеленым).

По материалом работы Е.А.Малолиной, А.Ю.Кулибина, Т.Л.Маршак, С.Т.Захидова, 2011г.

У накаутированных мышей по гену Rb, кодирующему белок ретинобластомы, в норме покоящиеся ***клетки Сертоли*** входят в цикл клеточной репродукции.

RB deletion causes impairment of Sertoli cell cycle quiescence.



C–F, immunofluorescent analysis of BrdU (red) and Sox9-GFP (green) indicates that occasional 6-wk-old Rb cKO ***Sertoli cells*** show persistent DNA synthesis (S phase). Arrows (C) indicate ***Sertoli cells*** that were not BrdU positive.

R. L. Nalam et al., Mol Endocrinol, November 2009, 23(11):1900–1913

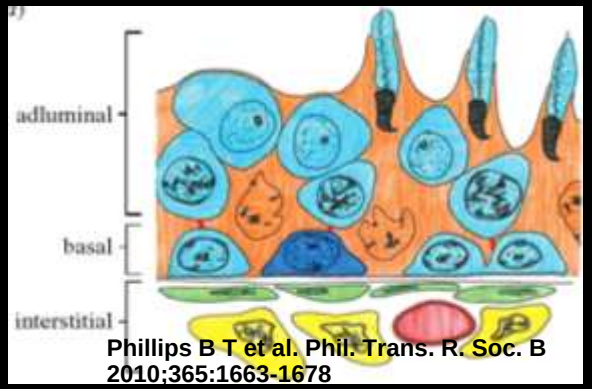
Если бы система дифференцировок взрослого организма, сложившаяся в эмбриональный и ранний постнатальный периоды, обусловливала жесткую детерминацию, не ослабленную существенно дедифференцировкой, то это мешало бы его возможности приспособления.

И.А.Рапопорт

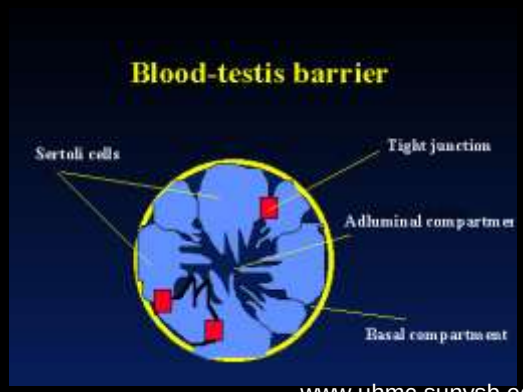
Детерминация – это всего лишь ограничение, но не завершение. Таким образом, **клетки Сертоли** не просто закончено дифференцированы, а просто детерминированы.

Детерминация – качественное определение системы. Состояние фолликулярной системы **клеток Сертоли** условно конечное.

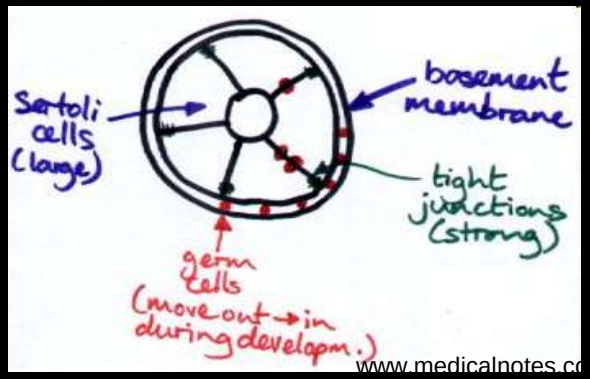
Для сперматогенеза деления *клеток Сертоли*, очевидно, не столь катастрофичны. Даже если в каком-нибудь уголке семенного канальца *клетка Сертоли* по каким-то причинам войдет в деление, развитие не приостановится, продукция спермиев будет продолжена за счет функционирования других сегментов этого канальца или других канальцев. Высокая адаптация сперматогенной системы отличает ее от многих соматических тканей, часто не способных противостоять вредным воздействиям.



Phillips B T et al. Phil. Trans. R. Soc. B 2010;365:1663-1678



www.uhmc.sunysb.edu/

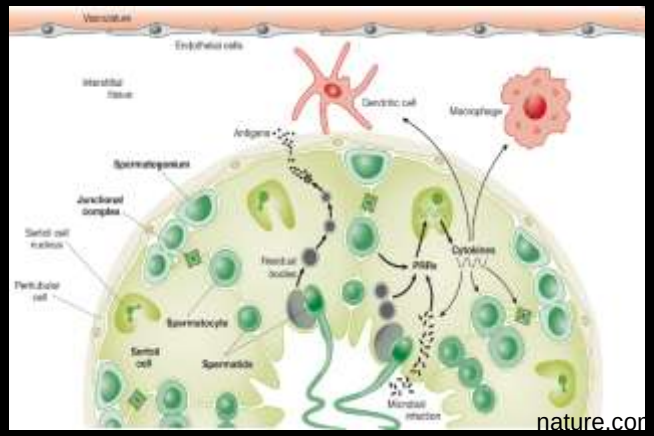


www.medicalnotes.co

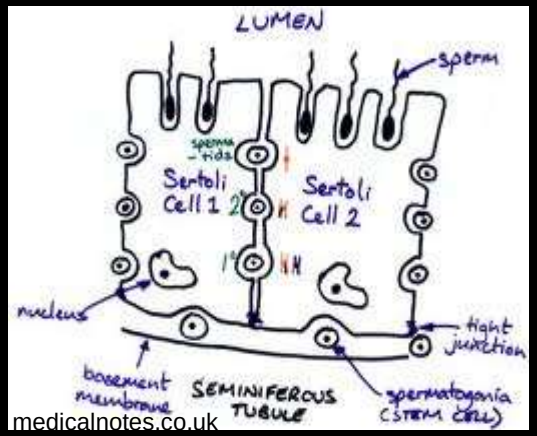
Итак, все эти, пока еще скупые данные, подтверждают положение о том, что необратимое блокирование размножения, случай довольно-таки редкий, и впервые показывают, что в моменты обострения, резких катастрофических изменений в семенниках млекопитающих, когда события начинают противоречить естественному порядку вещей, *клетки Сертоли* освобождаются от ограниченности своего существования, т.е. от запрета на реализацию пролиферативного потенциала и переключаются на режим активного деления.

Реализация пролиферативного потенциала *клеток Сертоли* дает толчок к обновлению сперматогенеза.

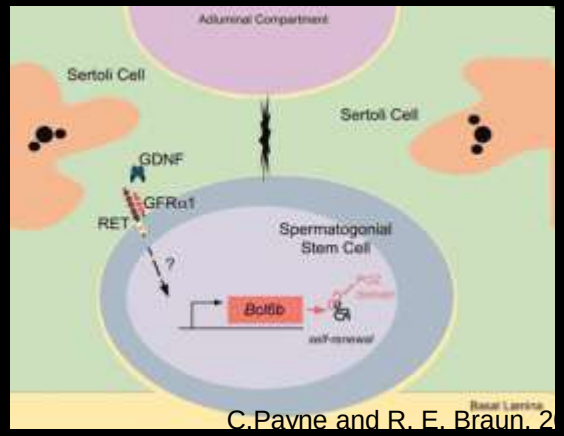
С другой стороны, полученные данные указывают на необходимость пересмотра парадигмы оценки состояния *сперматогенной системы* в условиях эксперимента и патологического развития.



nature.com



medicalnotes.co.uk



C.Payne and R. E. Braun, 2

Клетки Сертоли – важнейший элемент специализированного окружения ***ССК***, т.е. являются нишеобразующими клетками.

Нормальное течение сперматогенеза, топологическая и функциональная преемственность половых клеток возможны лишь после того, как завершится становление и упорядочение системы ***ССК*** и ее ниши*.

Гибель ***клеток Сертоли*** - начало краха всей системы развития мужских половых клеток.

* - ***ниша*** – это не просто пространственное разделение, это – место, где стволовые клетки могут безопасно жить и беспрепятственно самовоспроизводиться. ***Ниша*** – это функция. Чтобы выжить среди сильнейших - надо построить собственную нишу.

Когда что-то еще нельзя доказать экспериментально, теоретизация – неплохая замена.

Нельзя исключить, что:

- Одной из возможных причин гомосексуальной болезни может выступить какая-то, по моему образному выражению, «гей-мутация» в клетках Сертоли*;

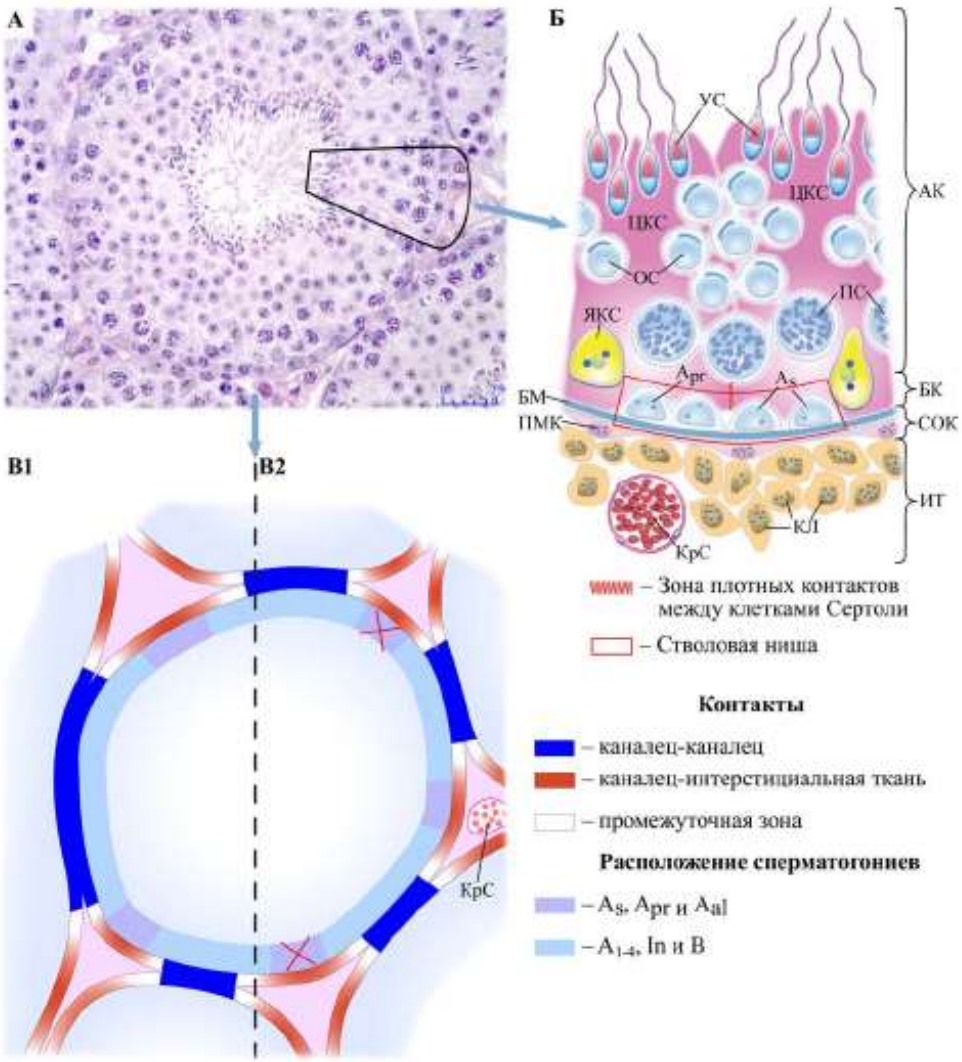
- Клетка Сертоли – потенциальная (скрытая) женская половая клетка;

** По аналогии в основе женской однополой любви могут лежать не только извращение и любопытство, но и генетические изменения («лесби-мутации») в системе развития женских половых клеток, в частности, обслуживающих их фолликулярных клетках.*

В отличие от других типов стволовых клеток, например, от стволовых клеток кроветворной ткани, ***сперматогониальные стволовые клетки (ССК)*** располагаются на плоскости, а не распределены по объему.

ССК занимают места в пристеночном слое семенных канальцев, располагаются по одиночно, изолировано друг от друга.

Причем недифференцированные сперматогонии - ***ССК***, ***сперматогонии типов А***$_{спаренные}$ и ***А***$_{групповые}$ - распределены вдоль базальной мембраны неслучайно, но находятся в местах, где каналец контактирует с интерстициальной тканью семенника, причем в точках разветвления кровеносных сосудов. Именно эти места в интерстиции очень богаты андрогенсинтезирующими ***клетками Лейдига***, что отчасти подтверждает нишеобразующую роль этих клеток. В то же время все дифференцированные сперматогонии располагаются равномерно по всей базальной мембране семенного канальца.



А – срез семенника взрослой мыши (окраска гематоксилин-эозином по Эрлиху).

Б – схематическое изображение сегмента одного из семенных канальцев, а также, окружающей его интерстициальной ткани.

Обозначения:

АК – адлюминальный компартмент,

БК – базальный компартмент,

БМ – базальная мембрана,

ИТ – интерстициальная ткань,

КЛ – клетки Лейдига,

КрС – кровеносный сосуд,

ПМК – перитубулярные мышечные клетки собственной оболочки семенного канальца,

ПС – пахитенные сперматоциты, ***ОС*** – округлые сперматиды, ***СОК*** – собственная оболочка канальца, ***УС*** – удлиняющиеся сперматиды, ***ЦКС*** – цитоплазма ***клеток Сертоли***, ***ЯКС*** – ядро ***клетки Сертоли***.

Линейка – реальный размер в мкм. ***В1*** и ***В2*** – схема локализации ***ССК*** на базальной мембране семенных канальцев.

По данным (Chiarini-Garcia et al., 2003) - ***В1*** – ***ССК*** расположены в местах контакта канальца с интерстициальной тканью и отсутствуют в местах контакта каналец-каналец.

По современным представлениям (Yoshida et al., 2007) – ***В2*** – ***ССК*** расположены напротив тех участков интерстициальной ткани где лежат крупные кровеносные сосуды, в точке их разветвления.

Вообщем, такова в грубом приближении сетевая топология ***сперматогенной системы***, схема расположения и соединения ее различных компонентов.

Сетевая топология предусматривает наличие центрального устройства - структуры (так называемого хаба, концентратора). Обычно к хабу подключаются другие сетевые устройства. В семенниках роль концентратора пропускных сигналов выполняет ***клетка Сертоли***.

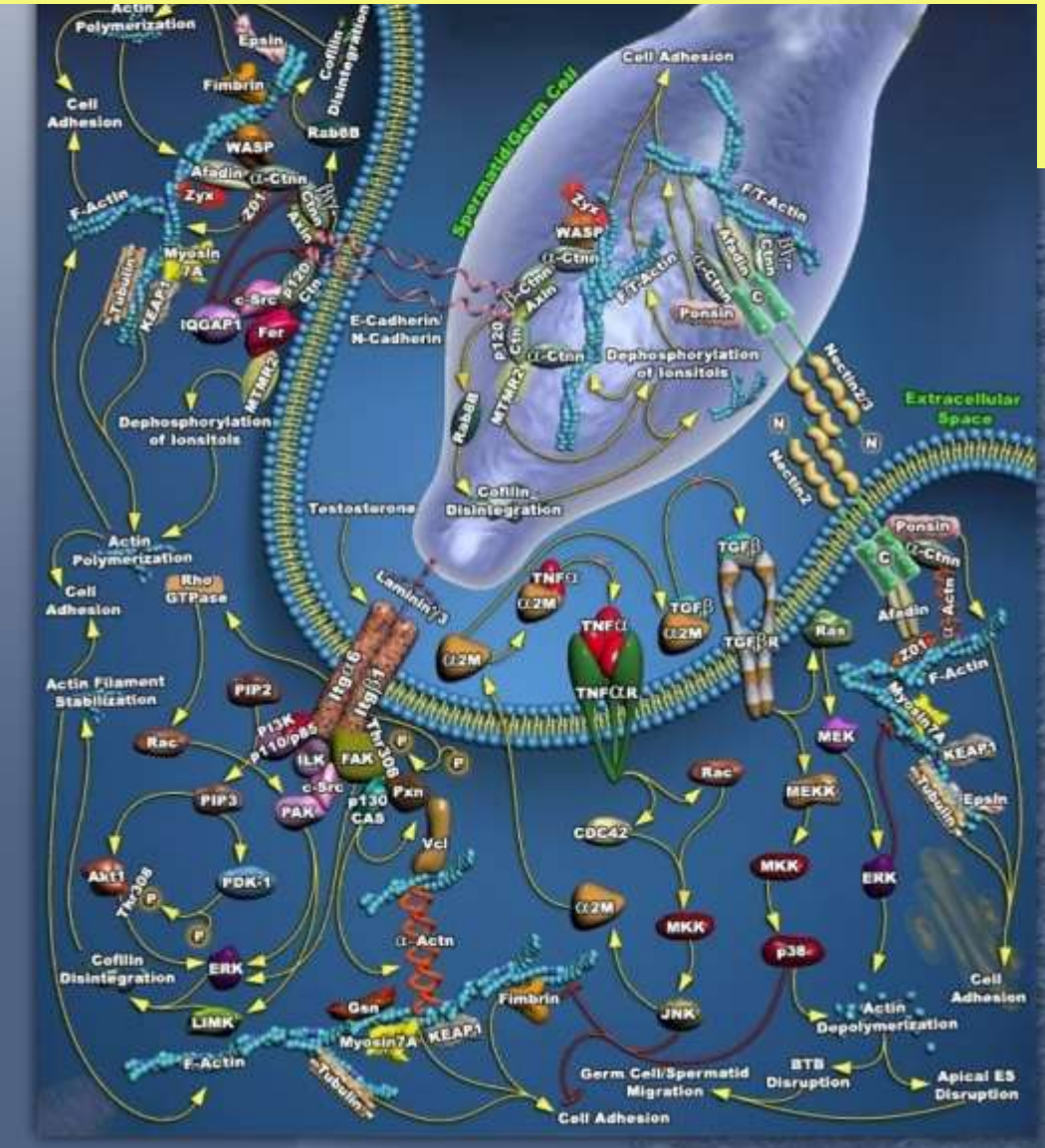
А *другими сетевыми структурами* являются сперматогенные клетки, объединенные в синцитиальные клоны, интерстициальная ткань и базальная мембрана.

Воспринимаемые ***клетками Сертоли*** регуляторные сигналы могут транслироваться либо с усилением, либо ослаблением на все сперматогенные клетки или на конкретный тип клеток.

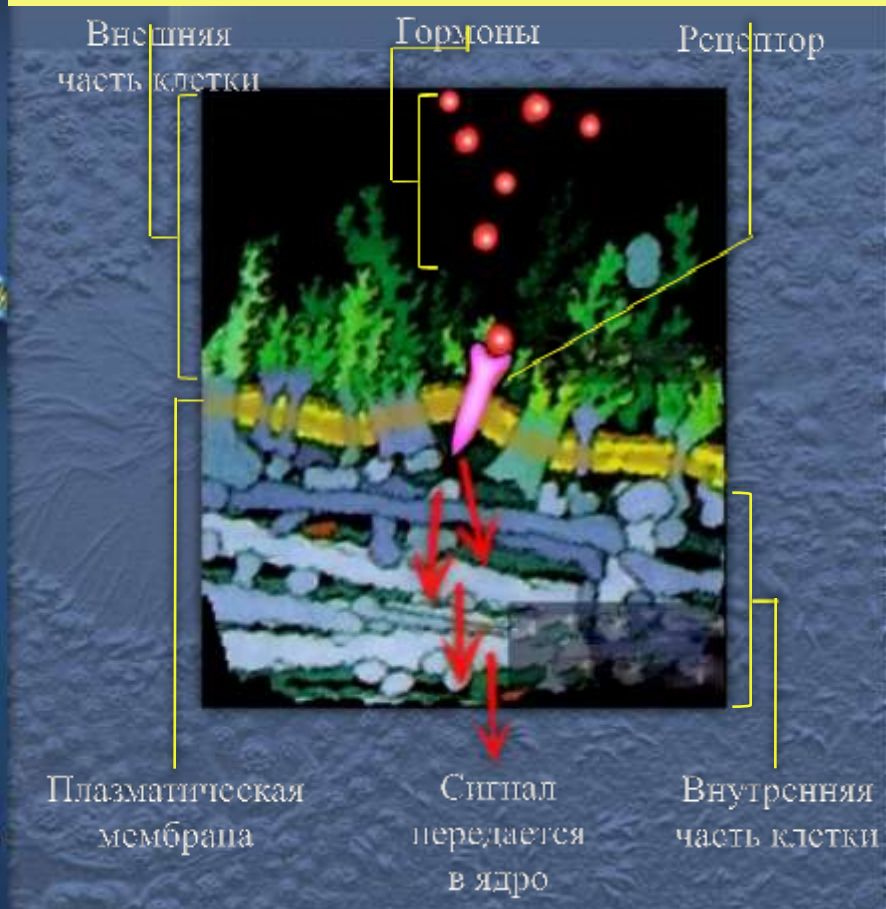
Как известно из теории сложных систем, передача информации между системами осуществляется приемо-передающими устройствами.

В клетках роль таких устройств выполняют, в первую очередь, рецепторы и лиганды.

Схема взаимодействия клетки Сертоли с удлиняющейся сперматидой, вложенной в цитоплазматический карман клетки Сертоли. Показано множество разнообразных белковых сигнальных молекул, рецепторов. Стрелки указывают пути распространения сигнальной информации.

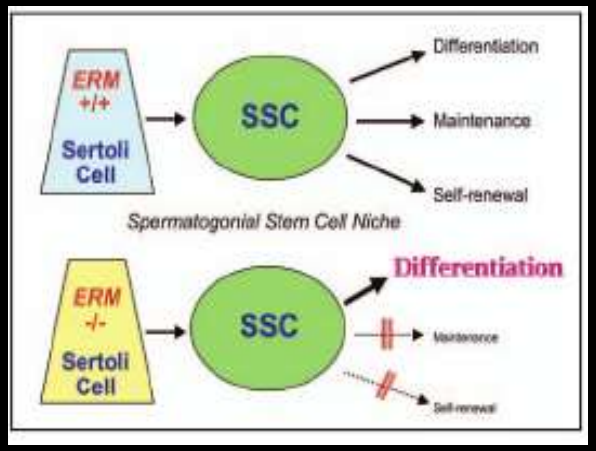


Предположим, что в качестве сигнальной молекулы-лиганда выступает *фолликулостимулирующий гормон (ФСГ)*, после его взаимодействия с рецептором, сигнальная информация докатывается до хвостового отдела. И здесь по механизму резонансного возбуждения стимулируется активность ферментных систем, окружающих концевой домен рецепторного белка, возникает созидательный хаос, запускающий каскад биохимических реакций. Сигнал достигает гена, контролирующего синтез определенного белка, например, фактора стволовой клетки.



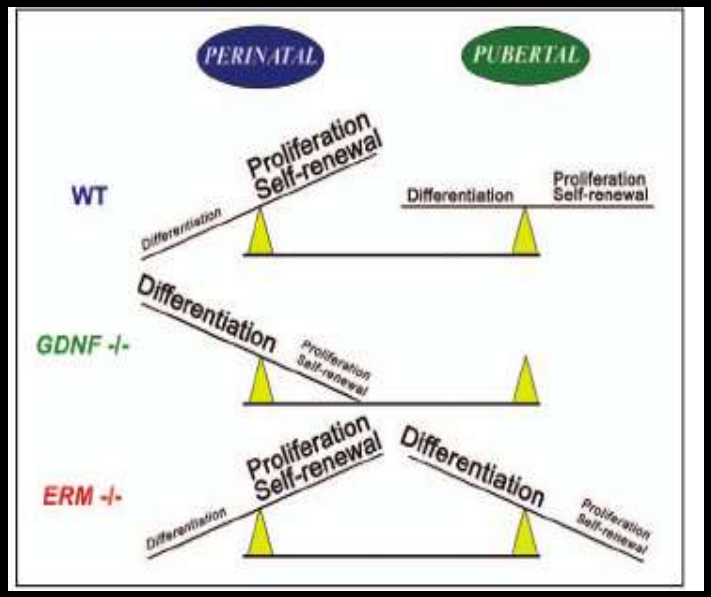
qiagen.com

с сайта Kuriyan Lab, UC Berkeley



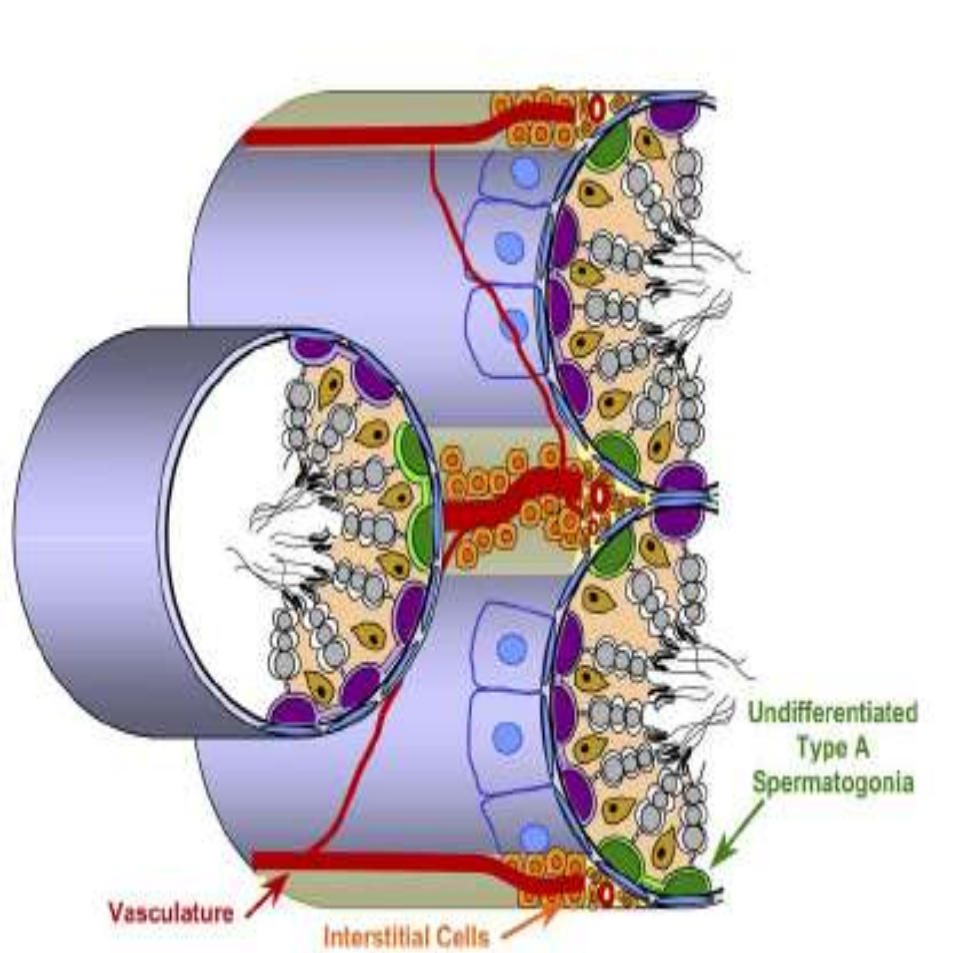
Sertoli cell expression of ERM is essential for maintenance of the ***spermatogonial stem cell*** (***SSC***) niche. In the ERM-/- mice, ***Sertoli cells*** do not maintain ***SSC*** self-renewal, but rather show a continuation of stem cell differentiation.

The stem cell population requires a balance between differentiation, proliferation and self-renewal. During the perinatal period of development, the balance is higher for self-renewal, as the testis size becomes established through ***Sertoli cell*** proliferation. In the pubertal period and adult, testis size and sperm production reach a plateau, with a balance between stem cell differentiation and self- renewal, as ***Sertoli cells*** no longer divide and they support a fixed number of germ cells. In the GDNF-/- mouse, stem cell self-renewal is inhibited and differentiation is enhanced, without spermatogenesis becoming established. In the ERM-/- mouse, the perinatal period appears to be normal, but stem cell is inhibited during the pubertal period, while differentiation is enhanced (as apoptosis was factor ERM is unique in that its expression not changed), resulting in the depletion of successive layers of new germ cells.



R A Hess et al. Cell Cycle 5:11, 1164-1170, 1 June 200

A Diagrammatic Representation of the Vascular/Interstitial Niche for the *Undifferentiated Spermatogonia* in mouse testes.



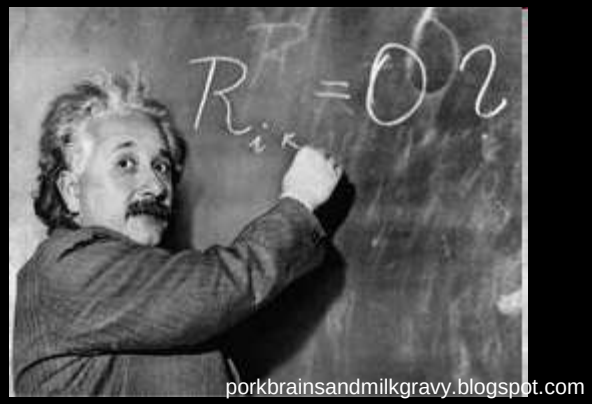
G.Shetty, M.L.Meistrich Cell Stem Cell 1, October 2007

Portions of three neighboring seminiferous tubules (gray) are shown with the surface in contact with the vascular/interstitial zones shaded in light yellow. The interstitial space (yellow) contains the blood vessels (red) and interstitial cells (orange). The peritubular myoid cells (blue) surround the tubules, which contain ***undifferentiated type A spermatogonia*** (green), ***differentiated spermatogonia*** (violet), ***spermatocytes*** and ***spermatids*** (not colored), and ***Sertoli cells*** (tan).

Кто занимается *сперматогенезом*, тот знает, что внешний облик половых клеток, в особенности клеток *сперматогониального компартмента*, во многом зависит от методов фиксации, заливки, окраски и визуализации, т.е. получения изображений на препаратах и слайдах. Ну, и конечно же от наблюдателя, оттого что у него на уме.

Хотим мы того или не хотим, наука субъективна.

И хорошая теория подчиняет себе эксперимент.



Сегодня новые методы и новые люди лучше, чем 30 - 40 лет тому назад, описывают морфологические особенности ***сперматогониальных стволовых (ССК)*** и ***прогениторных (сперматогониев типов $A_{pr(спаренные)}$ и $A_{al(групповые)}$) клеток***, индивидуальность которых заметно отличается от уровня организации ***дифференцирующихся сперматогониев***.

Так, у грызунов ***ССК*** имеют крупные овальные ядра с диффузно распределенным хроматином, плотными гетерохроматиновыми глыбками, 1–2 сильно окрашенными ядрышками неправильной формы, наличием 1 ядерной вакуоли.

Все эти характерные морфологические особенности плюс топография дают возможность специалистам сравнительно легко идентифицировать ***ССК*** без дополнительного маркирования.

И только отдельными нюансами, оттенками, тонкими незначительными переходами отличаются ***сперматогонии A_{pr} и A_{al}*** от ***ССК***.

И только двум – трем – четырем лабораториям в мире под силу отличать эти клетки друг от друга.

Профессор, действительный член Национальной академии наук США Ральф Бринстер – один из ведущих мировых специалистов в области исследований проблем сперматогенеза.

Стволовые клетки: самообновляются и генерируют клетки, дифференцирующиеся в определенные типы клеток. Классифицируются на два типа: эмбриональные и взрослые, региональные клетки.

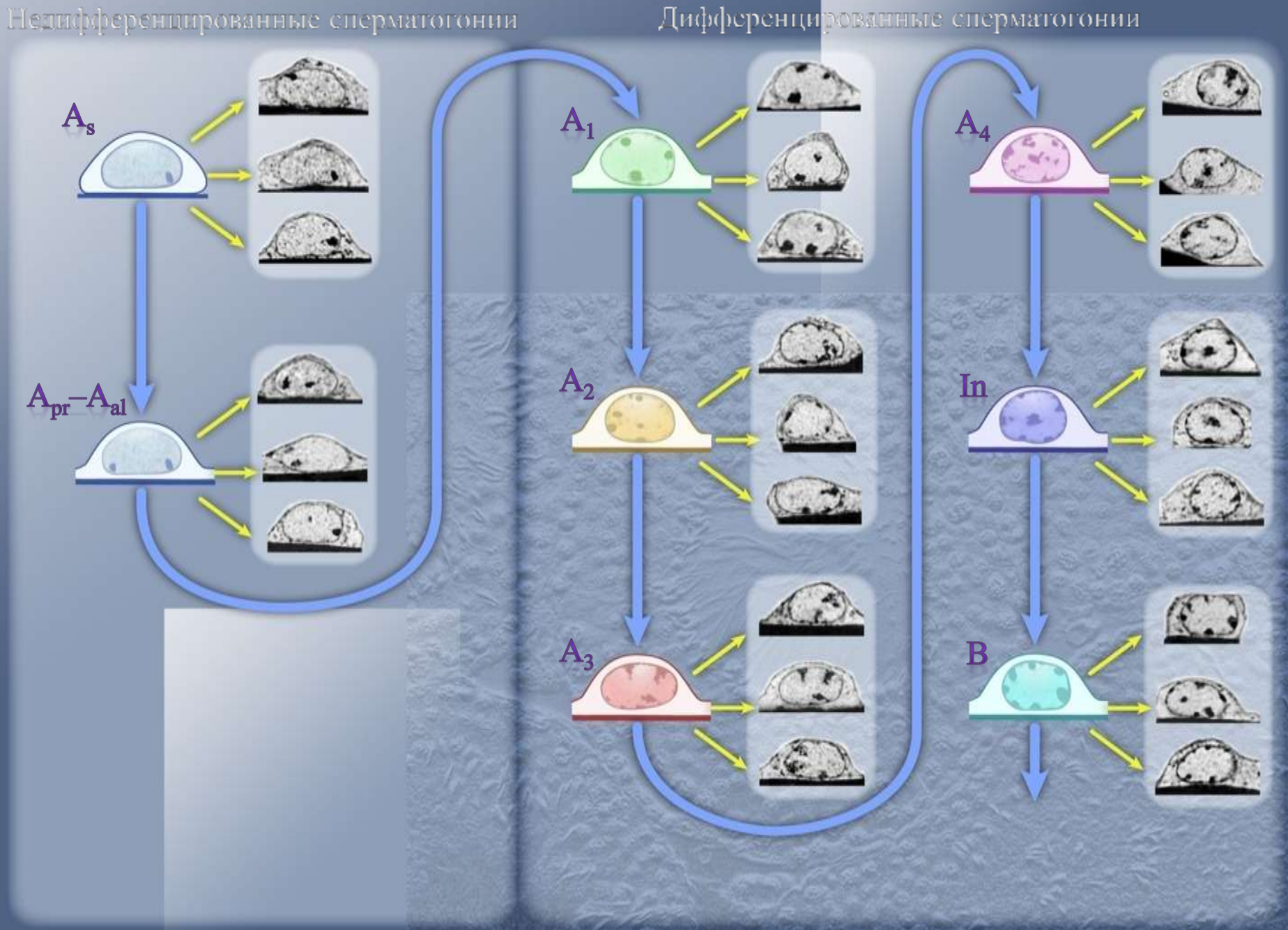
Сперматогониальные стволовые клетки (ССК): популяция стволовых клеток в семенниках постнатальных млекопитающих. Самообновление и дифференцировка ССК служит основой для сперматогенеза.

Самообновление: уникальная способность стволовых клеток воспроизводить самих себя на протяжении длительного времени без коммитации к дифференцировке.

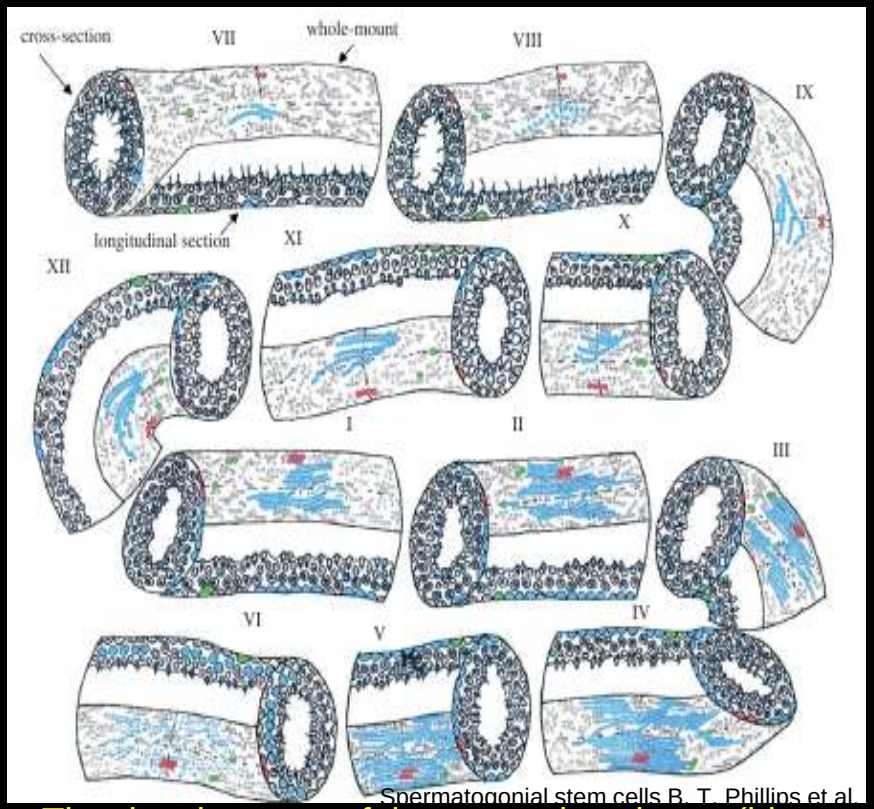
“It appears that housing females with a male mouse delays the decline of reproductive processes at the cellular level by somehow affecting the cells surrounding the stem cells that produce spermatozoa in the testes. Whether this female influence occurs in other species is not known”, - says ***Ральф Бринстер***.

It is known that increasing age brings with it a decrease in male fertility; however the factors that delay aging are not yet known. It’s stated that abnormal spermatogenesis was noticed in the lonely mice sooner than it occurred in the mice housed with females. This hints that maybe the sooner damage in the spermatogenesis could account for the earlier decrease in fertility in the lonely mice. The study authors state that females can be credited for the modification of various physiological and psychological responses in the males.

Морфологические характеристики сперматогониальных клеток мыши



по данным Chiarini-Garcia & Russell, 2001



Spermatogonial stem cells B. T. Phillips et al.

Mouse spermatogenic clone development by stage. The mouse spermatogenic cycle contains twelve stages (I–XII). Each stage is temporally unique, and the stages in the diagram represent the relative time each stage lasts in the mouse. Each stage in the diagram is shown in cross-sectional, longitudinal and whole-mount perspectives (labelled in stage VII). Three putative spermatogonial clones are highlighted in blue, red and green. The dotted lines in the whole-mount perspective indicate the planes of the cross section and longitudinal section views. For example, in stage VII, the red cell is in the vertical line and therefore appears in the cross-sectional view. A green cell is in the horizontal line, so is observed in the longitudinal section view.

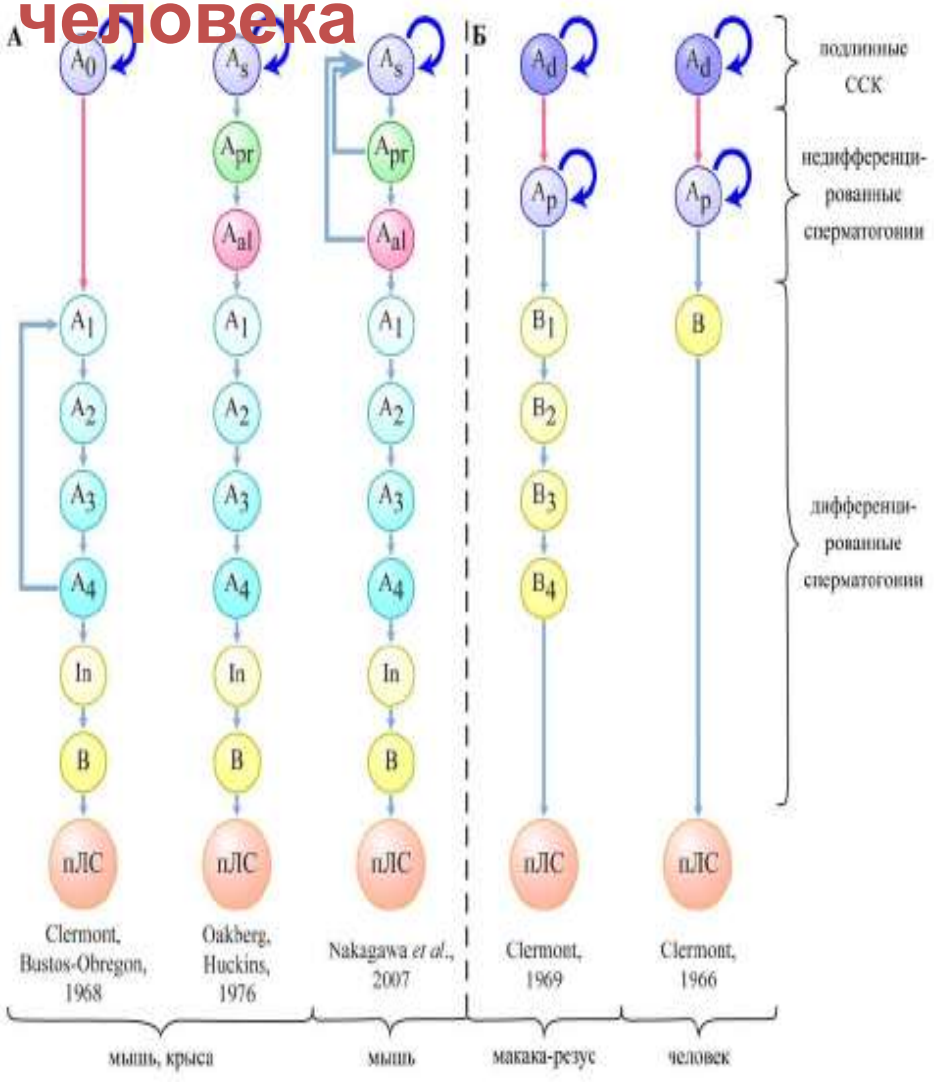
The development of three putative clones (blue, red and green) through one cycle of the seminiferous epithelium is shown. Stage VII: ***Aal-16*** (blue); ***Apair*** (red); ***Asingle*** (green); stage VIII: ***A1*** (clone of 16) (blue); ***Apair*** (red); ***Asingle*** (green); stage IX: A2 (clone of 32) (blue); ***Apair*** (red); ***Asingle*** (green); stage X: ***A2*** (clone of 32) (blue); ***Aal-4*** (red); ***Apair*** (green); stage XI: ***A3*** (clone of 64) (blue); ***Aal-4*** (red); ***Asingle*** (x2) (green); stage XII: ***A3*** (clone of 64) (blue); ***Aal-4*** (red); ***Asingle***(x2) (green); stage I: ***A4*** (clone of 128) (blue); ***Aal-8*** (red); ***Asingle*** and ***Apair*** (green); stage II: ***intermediate spermatogonia*** (clone of 256) (blue); ***Aal-8*** (red); ***Asingle*** and ***Apair*** (green); stage III: ***intermediate spermatogonia*** (clone of 256) (blue); ***Aal-8*** (red); ***Asingle*** and ***Apair*** (green); stage IV: ***Type B Spermatagonia*** (clone of 512) (blue); ***Aal-8*** (red); ***Asingle*** and ***Apair*** (green); stageV: ***Type B Spermatagonia*** (clone of 512) (blue); ***Aal-8*** (red); ***Asingle*** and ***Apair*** (green); stage VI: ***primary spermatocytes*** (lifting off the basement membrane) (blue); ***Aal-8*** (red); ***Asingle*** and ***Apair*** (green).

У мышей число ***ССК*** на семенник равно 35000, у крыс – 350000 и в целом, по разным подсчетам, составляют 0.01–0.03% от общего числа всех клеток сперматогенного ряда и не более 1% в ***сперматогониальном компартменте***.

ССК большую часть времени находятся в состоянии покоя и делятся нерегулярно. Их клеточный цикл измеряется не часами, а сутками. Так, у мышей ***ССК*** делятся раз в 8.5 суток, у крыс − 12.9, китайского хомячка – 17, а у человека через каждые 16 суток.

Возможно, только 1 из 110 ***недифференцированных сперматогониев*** сохраняет свойство “стволовости” и способность образовывать колонии при трансплантациях, остальные же безвозвратно коммитированы на дифференцировку.

Модели организации *сперматогониального компартмента* у млекопитающих животных и человека



Клермо и Бустос-Обрегон предполагают существование резервных, покоящихся *ССК* – *сперматогониев* A_0 и активно делящихся – *сперматогониев типа* $A_{1–4}$. Оакберг и Хаккинс исключают наличие покоящихся клеток у мышей. Роль подлинных *ССК* здесь играют *сперматогонии* A_s, которые выполняют роль как резервных *ССК*, так и *ССК*, дающих начало новым дифференцирующимся половым клеткам. Накагава, Йошида и соавт., в отличие от предыдущей модели, предполагают возможность восстановления *сперматогониев* A_s в случае их потери за счет распада цепочек *сперматогониев* A_{pr} *и* A_{al} на отдельные клетки и их возврат к стволовому состоянию.

Клермо обнаружил у приматов и человека два типа *ССК*: резервные покоящиеся *сперматогонии* A_{dark} *(*A_d*)* и циклично делящиеся *сперматогонии* A_{pale} (A_p), которые по своим свойствам относятся к недифференцированным сперматогониям. Если проводить эволюционные аналогии, то *сперматогонии* A_{dark} у приматов и человека могли возникнуть из *сперматогониев* A_s у мышей, которые оставили за собой только функцию резерва. *Сперматогонии же* A_{pale} возникли из популяции *недифференцированных сперматогониев*, потерявших свою синцитиальную структуру, но зато приобретших способность к самообновлению. Обозначения: Синие стрелки – деления самообновления, красные стрелки – деление резервных *ССК*, *пЛС – прелептотенные сперматоциты*.

Модели организации *сперматогониального компартмента* у млекопитающих животных и человека

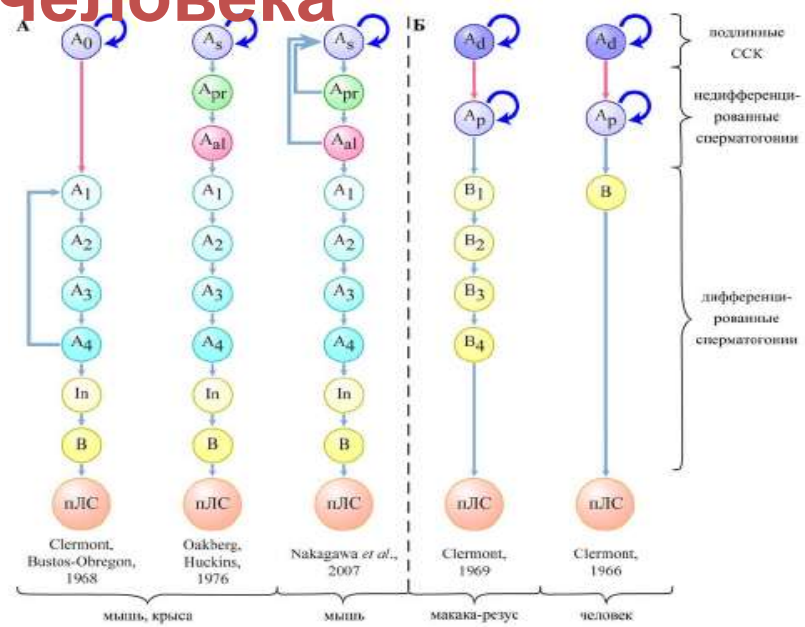


TABLE 1. A Comparison of Markers for Human and Rodent Spermatogonia

Marker	Human	Rodent	References
α6-integrin (CD49f)	+	+	(Shinohara et al., 1999; Conrad et al., 2008)
β1-integrin (CD29)	–	+	(Schaller et al., 1993; Shinohara et al., 1999)
CD9	?	+	(Kanatsu-Shinohara et al., 2004b)
CD133	+	?	(Conrad et al., 2008)
CDH1	?	+	(Tokuda et al., 2007)
CHEK2	+	?	(Bartkova et al., 2001)
GFRA1	+	+	(Meng et al., 2000; Conrad et al., 2008)
GPR125	+	+	(Seandel et al., 2007; Dym et al., 2009)
KIT	–	+	(Yoshinaga et al., 1991; Rajpert-De Meyts et al., 2003)
MAGE-A4	+	?	(Rajpert-De Meyts et al., 2003)
Neurogenin3	?	+	(Yoshida et al., 2004)
NSE	+	?	(Rajpert-De Meyts et al., 2003)
PLZF	+	+	(Buaas et al., 2004; Costoya et al., 2004)
POU5F1	–	+	(Looijenga et al., 2003; Ohbo et al., 2003)
RET	?	+	(Naughton et al., 2006)
STRA8	?	+	(Giuili et al., 2002)
Thy-1 (CD90)	+	+	(Kubota et al., 2003; Conrad et al., 2008)
TSPY	+	–	(Schnieders et al., 1996; Kido and Lau, 2006)

Markers known to be expressed (+) or absent (–) and unknown (?) in human and rodent spermatogonia are listed. Abbreviations: CDH1, cadherin 1, type 1, E-cadherin; CHEK2, CHK2 checkpoint homolog; GFRA1, GDNF family receptor alpha 1; GPR125, G protein-coupled receptor 125; MAGE-A4, melanoma antigen family A, 4; NSE, neurone-specific enolase; PLZF, promyelocytic leukemia zinc finger protein; POU5F1, also known as Oct-4; STRA8, stimulated by retinoic acid gene 8; TSPY, testis specific protein, Y-linked 1.

Число *сперматогониев типов Атемные* и *Асветлые* одинаково, но морфологически они разные. *Сперматогонии Атемные* отличаются от *сперматогониев Асветлые* диффузным распределением хроматина, отсутствием гетерохроматиновых глыбок, более ярким окрашиванием гематоксилином. *Сперматогонии типа Асветлые* функционируют как клетки-предшественники, способные самообновляться и приносить сперматозоиды.

Кстати, в свое время Леонид Иванович Корочкин писал: “В ходе клеточного деления из стволовых клеток возникают материнская и дочерняя клетки. Материнская используется для самоподдержания популяции, а дочерняя либо «выходит» в камбиальную клетку, либо непосредственно в дифференцировку”. Именно так ведут себя *стволовые сперматогонии Асветлые* в семенниках приматов.

Как видно из этого рисунка, у обезьян и человека в отличие от лабораторных грызунов, клетки-предшественники - *сперматогонии типа Асветлые* - дифференцируются сразу в *сперматогонии типа В*, причем у обезьян выявлено 4 генерации *сперматогониев В*, а у человека – одна (Ehmcke et al., 2006; Ehmcke, Schalat, 2006). Подсчеты показали, что у человека *сперматогонии А-светлые, сперматогонии типа В и прелептотенные сперматоциты* соотносятся как 1:2:4.

Что касается *сперматогониев типа Атемные*, то считается, что в норме они митотически инертны. И это свойство, вероятно, способствует сохранению целостности их генома. Они, подобно *стволовым сперматогониям A_0*, представляют собой резервные клетки, которые могут переходить к активным делениям только при условии сильного обеднения пула *сперматогониев Асветлые* (de Rooij, Russell, 2000; Aponte et al., 2005; Ehmcke et al., 2006).

Тридцать пять лет тому назад Леблон и соавторы предположили, что стволовые клетки у млекопитающих представляют собой неспециализированные клетки, которые способны делиться и продуцировать новые стволовые и дифференцированные клетки.

К дифференцированным клеткам относятся те клетки, которые находятся на различных стадиях специализации: они могут делиться, чтобы дать начало другим дифференцированным, но не новым стволовым клеткам. Касаясь вопроса самоподдержания и дифференцировки ***ССК***, Клермо и соавторы выдвинули гипотезу, согласно которой в

семенниках млекопитающих сосуществуют две популяции ***ССК***

нециклирующие (резервные), спорадически делящиеся ***сперматогонии типа*** A_0 и обновляющиеся ***сперматогонии типов*** $A_{1–4}$.

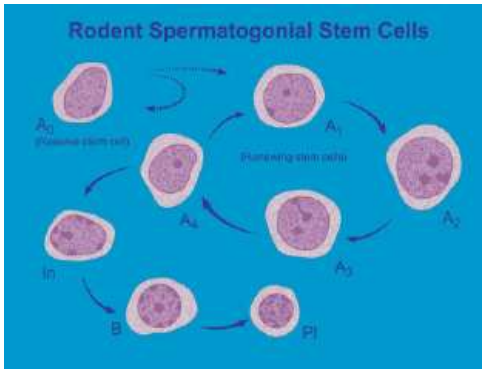
При этом кардинальная роль в сперматогенезе отводится ***сперматогониям*** A_4, которые после деления формируют как

сперматогонии A_1, так и более дифференцированные ***сперматогонии промежуточного типа (In)***.

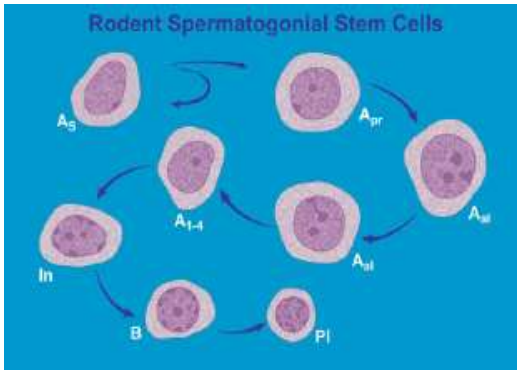
Что касается так называемых “дремлющих” ***стволовых клеток*** A_0, то они способны приступать к активной пролиферации только в случае деструкции ***сперматогониальной системы*** $A_{1–4}$, вызванной повреждающими факторами.

Примерно в то же время американские исследователи Оакберг и Хаккинс, а позже присоединившийся к ним голландский ученый де Ройдж, исключили возможность существования в системе сперматогенеза покоящихся ***ССК***, а также дедифференцировку и выход из синцития продвинутых в развитии ***сперматогониев*** A_4. С помощью методов радиоавтографии, подсчетов ***сперматогониев различных типов*** на срезах и тотальных препаратах в норме и в ходе репопуляции семенных канальцев у грызунов после радиационных и химических воздействий они обнаружили, что именно изолированные друг от друга ***сперматогонии*** A_0 (в современной номенклатуре ***сперматогонии типа*** A_s) функционируют как стволовые клетки. На основании кинетики делений была выделена новая группа ***сперматогониев***, названных из-за своего сходства с ***ССК недифференцированными сперматогониями***.

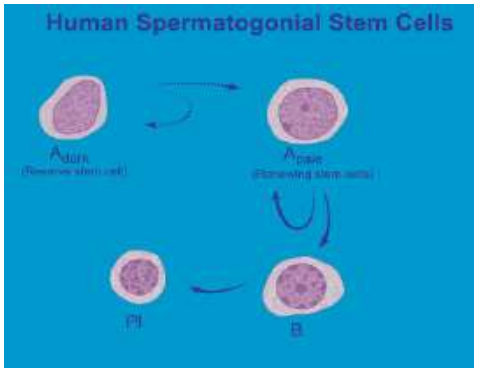
Модифицированные схемы обновления сперматогониальных стволовых клеток у грызунов, а также у человека, предложенные американскими исследователями Мартином Димом, Марией Коккинаки и Зюпин Хе.



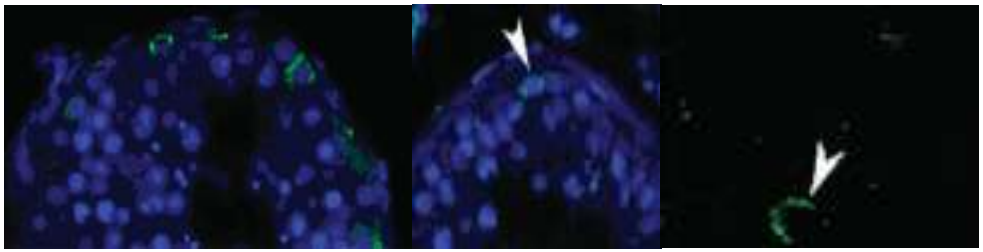
The type A_0 human spermatogonial stem cell is spermatogonia are considered the reserve stem cells of rodent testis, whereas the a subpopulation of the type $A_{1–4}$ spermatogonia are the renewing stem cells. The type $A_{1–4}$ can divide and cause the intermediate (In) spermatogonia, type *B* spermatogonia, *preleptotene spermatocytes* (Pl), and sperm, successively. It was also suggested that some of the type A4 spermatogonia can also cause new stem cells (Modified from Clermont and Bustos-Obregon, 1968; Dym and Clermont, 1970; Dym, 1994).



A second proposed scheme of stem cell renewal in rodent testis. The *As* spermatogonia are thought to be the stem cells in the testis, whereas the *Apr* and *Aal* spermatogonia are the progenitor cells. In this scheme, the *Apr* and *Aal* are also considered morphologically undifferentiated spermatogonia, whereas type $A_{1–4}$ spermatognia, *intermediate* (In) spermatogonia, and type *B* spermatogonia are differentiating rodents. (Modified from Huckins, 1971; Oakberg, 1971).



The *Adark* spematogonia are believed to be the reserve stem cells in the testis, whereas the *Apale* are the renewing stem cells. The *Apale* can divide and either cause new *Apale* or differentiated type *B* spermatogonia.

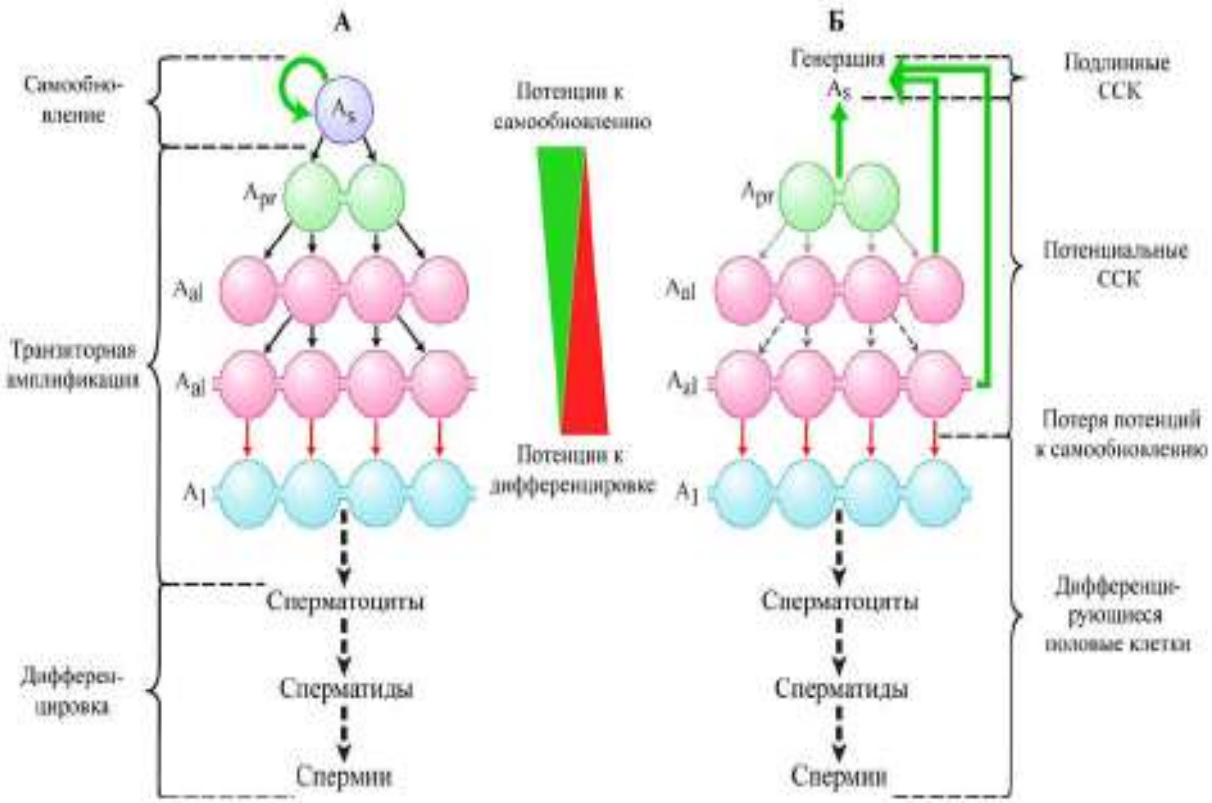


Phenotypic characteristics of human SSCs. Immunohistochemistry reveals that GPR125 is expressed in a subpopulation of spermatogonia (arrowheads) along the basement membrane of adult human seminiferous tubules. GPR125 seems to be a potential surface marker for human SSCs. GPR125 staining–green; DAPI nuclear staining–blue.

MartinDym et al., Birth Defects Research (Part C) 87:27–34, 2009

Через 30 лет компромиссную точку зрения высказали японские исследователи Накагава и Йошида. В сложных экспериментах с использованием импульсного мечения, специфических маркеров, трансгенных животных в сочетании с методами трансплантации и регенерации они показали, что в семенниках мышей система стволовых клеток на самом деле состоит из двух клеточных подсистем: ***подлинных ССК (“actual stem cells”)*** и ***потенциальных ССК (“potential stem cells”).*** Потенциальные клетки включают в себя небольшую часть ***недифференцированных сперматогониев типов As, Apr и Aal***.

Модель сперматогониального стволового компартмента, предложенная Накагавой и Йошидой (Nakagawa et al., 2007; Yoshida et al., 2007).



А – нормальные циклы сперматогенеза: подлинные *ССК* самообновляются и вступают в дифференцировку, потенциальные *ССК* только дифференцируются.

Б – потеря *подлинных ССК* вызывает распад *сперматогониев типа A_{pr} и A_{al}* на отдельные клетки, которые возвращаются к стволовому состоянию, восстанавливая пул *подлинных ССК*. При переходах *сперматогониев* $A_s \rightarrow A_{pr} \rightarrow A_{al}$ потенциал к самообновлению снижается и, наоборот, возрастает потенциал к дифференцировке.

Потенциальные ***стволовые клетки*** (*не путать с дремлющими клетками*) вместе с ***дифференцирующимися сперматогониями типов A1–4, In и B*** авторы отнесли к клеткам, которых теперь на Западе называют ***“transit-amplifying cells”*** (терминологически бывшие ***камбиальные клетки***) и рассматривают эту популяцию как некую преходящую фазу развития. Но не как самостоятельную популяцию клеток, как это было принято раньше.

Вообще, в старой литературе есть такой порядок: ***Стволовая клетка -> Камбиальная клетка -> Дифференцирующаяся клетка -> Зрелая клетка.***

Надо сказать, что идея о ***транзиторно-амплифицирующихся сперматогониях*** и их способности сохранять свойства ***ССК*** - не нова. Поттен называл транзиторные клетки ***потенциальными стволовыми клетками*** и считал, что при определенных условиях, например, гибели предсуществующих ***стволовых клеток***, они могут заместить последние.

В японской модели показано, что при нормальном течении сперматогенеза ***подлинные ССК*** могут самообновляться и коммитроваться до тех пор, пока сохраняется целостность их собственной популяции, тогда как ***потенциальные ССК*** пролиферируют и дифференцируются только в направлении мейоза и спермиогенеза. Но в критические моменты времени, когда подлинные ***ССК*** становятся функционально неактивными, гибнут и освобождают ниши, запускается компенсаторный механизм, переключающий потенциальные ***ССК*** на процесс самообновления. Неясны пока молекулярно-генетические механизмы взаимопревращения ***недифференцированных сперматогониев.***

Правда, остается открытым вопрос, как при этом потенциальные ССК из числа сперматогониев Apr и Aal, освобождаются от цитоплазматических мостиков, связывающих их в цепочки.

В настоящее время существуют две классические теории относительно процессов самообновления и коммитации *сперматогониальных стволовых клеток (ССК)*

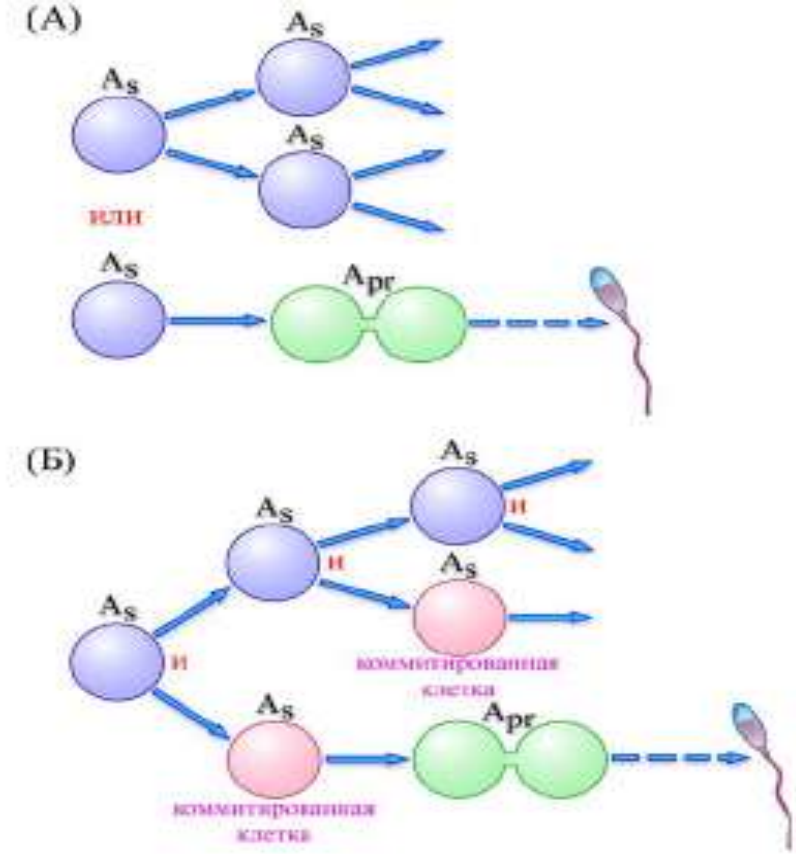


Схема симметричного (А) и асимметричного (Б) делений *ССК* (по данным de Rooij, Russell, 2000 с изменениями). Симметричный тип деления характерен для млекопитающих, асимметричный – для насекомых.

Согласно одной из них, ***ССК*** делится симметрично, давая начало двум дочерним клеткам: либо себе подобным, либо получившим ордер на дифференцировку.

Отличительной особенностью коммитированных клеток является наличие между ними цитоплазматического мостика, который возникает в результате отсутствия полного цитокинеза. В этом случае, т.е. когда ***ССК*** выходит на траекторию развития, открывается вакансия. И это, вероятно, создает условия для запуска механизма самообновления соседней ***ССК,*** в результате одна из вновь образовавшихся клеток как бы «делегируется» занять освободившееся пустое место. Только так на протяжении длительного времени может поддерживаться целостность и устойчивость стволового компартмента и ***сперматогенной системы*** в целом.

Когда разбегаются галактики, на освободившихся местах из нового, непрерывно рождающегося вещества образуются новые галактики. Только так поддерживается устойчивость и целостность Вселенной.

Мир в своих проявлениях един.

Другая теория - это концепция асимметричного деления ***ССК***. Деления, приводящего к образованию одной клетки, которая пополняет стволовой пул, другой – нацеленной на дифференцировку.

У млекопитающих деления с нарушенной симметрией происходят крайне редко,
и являются свойством характерным, очевидно, только для ***стволовых клеток***;
другие клетки обычно ведут себя одинаково. В норме асимметричный способ деления ***ССК***, очевидно, исключен.

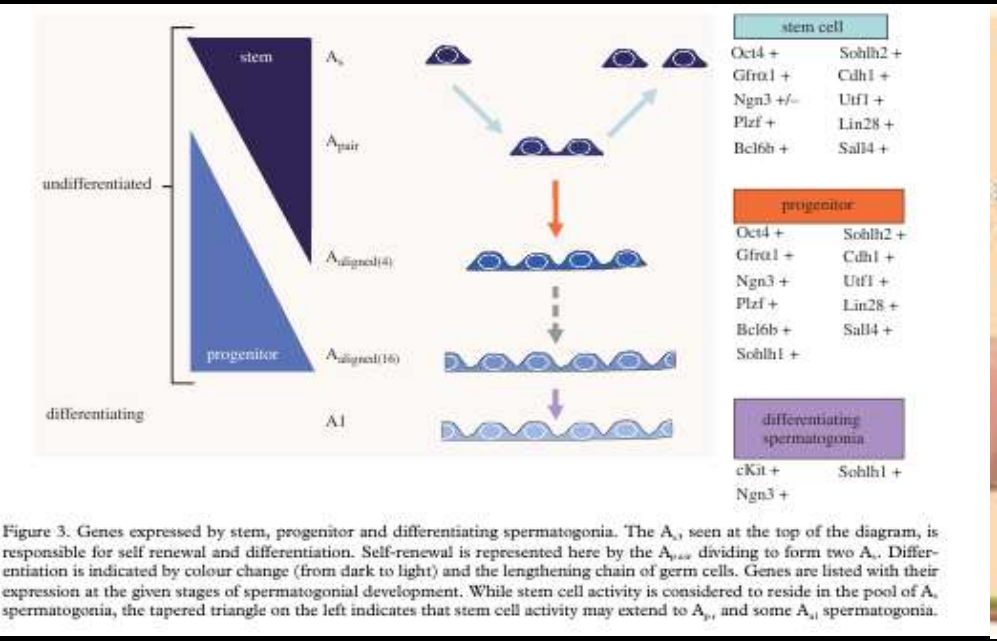
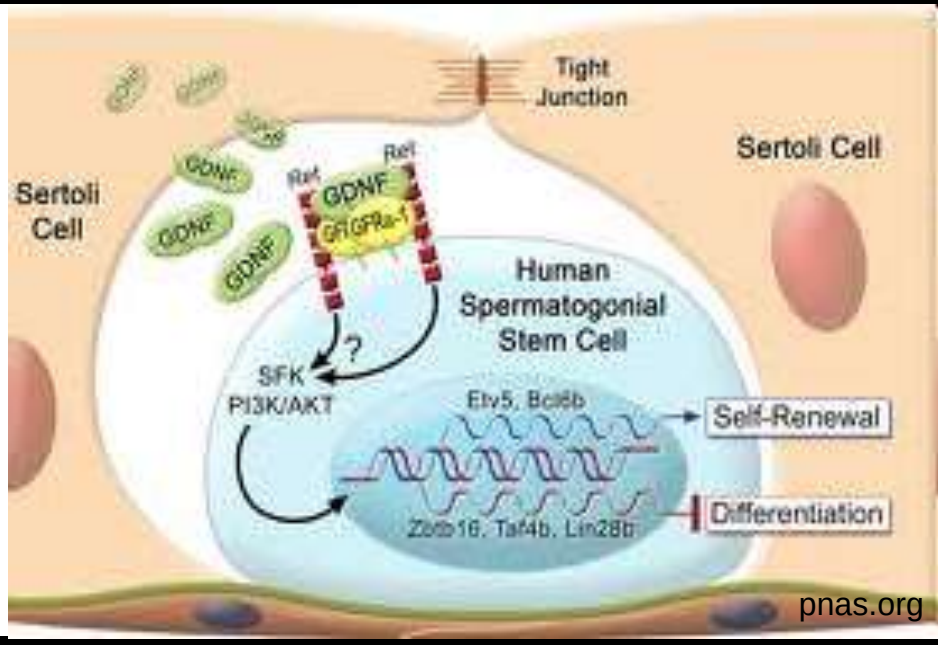
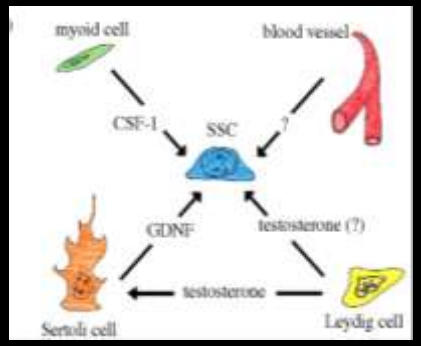


Figure 3. Genes expressed by stem, progenitor and differentiating spermatogonia. The A_s, seen at the top of the diagram, is responsible for self renewal and differentiation. Self-renewal is represented here by the A_{pair} dividing to form two A_s. Differentiation is indicated by colour change (from dark to light) and the lengthening chain of germ cells. Genes are listed with their expression at the given stages of spermatogonial development. While stem cell activity is considered to reside in the pool of A_s spermatogonia, the tapered triangle on the left indicates that stem cell activity may extend to A_{pr} and some A_{al} spermatogonia.



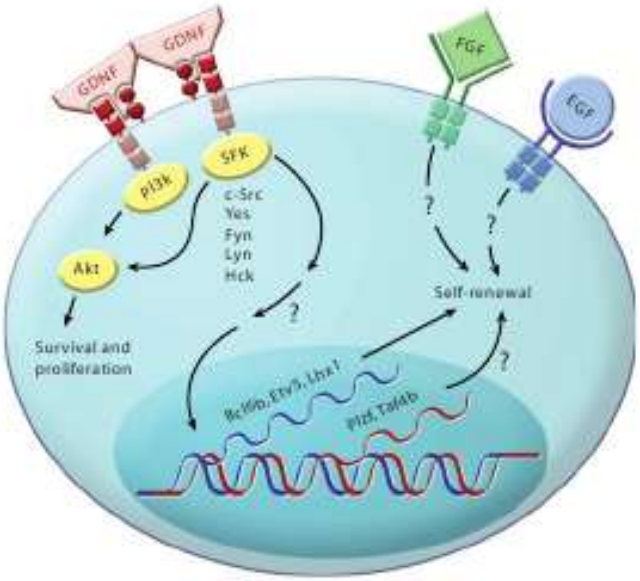
Phillips B T et al. Phil. Trans. R. Soc. B 2010;365:1663-1678



В настоящее время делаются попытки по раскручиванию молекулярных механизмов, регулирующих поведение ***сперматогониев***. Не все гены еще определены. Предполагается, что возможное их число может быть больше ста.

Все известные в настоящее время маркеры ***ССК*** не позволяют надежно отделить их от ***сперматогониев*** $A_{спаренные}$ ***и*** $A_{групповые}$.

Современное понимание молекулярных механизмов регуляции самообновления сперматогониальных стволовых клеток (ССК) у мышей в интерпретации американских исследователей Джона Оэтли и Ральфа Бринстера.



Current understand molecular mechanisms regulating spermatogonial stem cell (SSC) self-renewal in mice. Glial cell line–derived neurotrophic factor (GDNF) is the only growth factor demonstrated to have an essential role in regulating SSC self-renewal, and basic fibroblast growth factor (bFGF) or epidermal growth factor (EGF) enhances this influence GDNF binds to receptor complex consisting of c-Ret tyrosine kinase and the GPI (glycosylphosphatidylinositol)-anchored binding molecule Gfrα1 (GDNF family receptor alpha 1). This interaction activates PI3K(phosphoinositide 3-kinase) and Src family kinase (SFK) intercellular signaling mechanisms, leading downstream activation of Akt signaling, which influences general cellular functions such as survival and proliferation. SFK signaling also elicits a second pathway leading to the regulation of specific gene expression levels that are important for SSC self-renewal. The transcription factor – encoding *bcl6b* (B cell CLL/lymphoma 6, member B; also termed bazf), and *lhx1* (Lim homeobox protein1; also termed lim1) are regulated through the SFK-activated pathway and are important for themaintenance of self-renewing SSC cultures.

Five of the eight known mammalian SFK isoforms—c-Src (Rous sarcoma oncogene), Yes (Yamaguchi eral genes, including the transcription factor sarcoma viral oncogene), Fyn (Fynproto-oncogene), Lyn (Lyn tyrosine kinase and Hck (hemopoietic cell kinase)—are expressed in mouse SSCs. Additionally, observation of disrupted spermatogenesis in null mutant mice have pointed to an essential role of the transcription factors Plzf (promyelocytic leukemia zinc finger protein) and Taf4b [TATAbox–bindingprotein (TBP)-associated factor 4b] in mouse SSC self-renewal. However, GDNF does not influence expression of either Plzf or Taf4b in cultured SSCs, and the importance either molecule in SSC self-renewal in vitro has not been determined. To date mechanisms by which bFGF or EGF influences the self-renewal and survival SSCs have not been reported.

Главные белки – регуляторы самообновления и дифференцировки *ССК* (для мыши).

Белки		Клетки, экспрес-сирующие белок [1]	Известные индукторы экспрессии	Гены-мишени + рег. / – рег. [2]	Начало экспрессии, (дпр) [3]	Возраст на момент полного исчезнове-ния МПК у нокаути-рованных мышей	Ссылки
Сокращ. название	Полное название / класс						
Белки ответственные за поддержание стволового состояния ССК							
Oct-4	octamer-4 / фактор транскрипции	A_s, A_{pr}, A_{al}, ОС	Нет данных	Нет данных	1	Нет данных	Buaas *et al.*, 2004
Plzf	promyelocytic leukemia zinc-finger / фактор транскрипции	A_s, A_{pr}, A_{al}	Нет данных	*ash21, cldn11, cyp11a1, dmrt2, gpd1, hsd17b1, paip1, rbm5,9* / c-myc	~3,5	Нет полной потери МПК к 8 мес	Buaas *et al.*, 2004 Costoya *et al.*, 2004
Белки, поддерживающие самообновление ССК							
GDNF	glial cell line derived neurotrophic factor / фактор роста	КС	ФСГ	*bcl6b, erm, lhx1, numb, erg1,2,3, Sox-2* / *ngn3*	~1	8–10 нед	Meng, 2001 Hofmann *et al.*, 2005 Braydich-Stolle *et al.*, 2005
ERM	Ets related molecule / фактор транскрипции	КС, (A_s, A_{pr}, A_{al}) [4]	FGF-1,2,9	*stra8, Sdf-1, lix, Ccl7, dazl, Mmp-12, ki67, cyclin E2* / –	~15–20	10 нед	Chen *et al.*, 2005 Braydich-Stolle *et al.*, 2007
Taf4b	TBP-associated factors 4b / фактор транскрипции	A_s, A_{pr}, A_{al}	Нет данных	*stra8, c-ret* / –	~1	Нет полной потери МПК к 8 мес	Falender *et al.*, 2005
GFRα-1	GDNF family receptor α-1/ поверхностный рецептор	A_s, A_{pr}	GDNF	*bcl6b, erm, lhx1, numb, kcnh2, Sox-2* / *ngn3*	~3	8–10 нед	Naughton *et al.*, 2006 He *et al.*, 2007
c-Ret	ret proto-oncogene – recep-tor tyrosine kinase / поверхностный рецептор	A_s, A_{pr}, A_{al}	Taf4b	*bcl6b, erm, lhx1, numb, kcnh2, Sox-2* / *ngn3*	~1	8–10 нед	Naughton *et al.*, 2006
Src	Rous sarcoma oncogene – Serine - Threonine protein kinases / киназа	КЛ, КС, СГ, СП	Нет данных	*n-myc, bcl6b, erm, lhx1* / –	~7	Нет данных	Gye *et al.*, 2005 Braydich-Stolle *et al.*, 2007 Oatley *et al.*, 2007
N-myc	nuclear proto-oncogene myc family / фактор транскрипции	A_s	GDNF	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Braydich-Stolle *et al.*, 2007
Bcl6b	B cell CLL/lymphoma 6 member b / фактор транскрипции	A_s, A_{pr}, A_{al}, ОС	GDNF	Нет данных	Нет дан-ных	Нет полной потери МПК к 4 мес	Oatley *et al.*, 2006, 2007

….продолжение

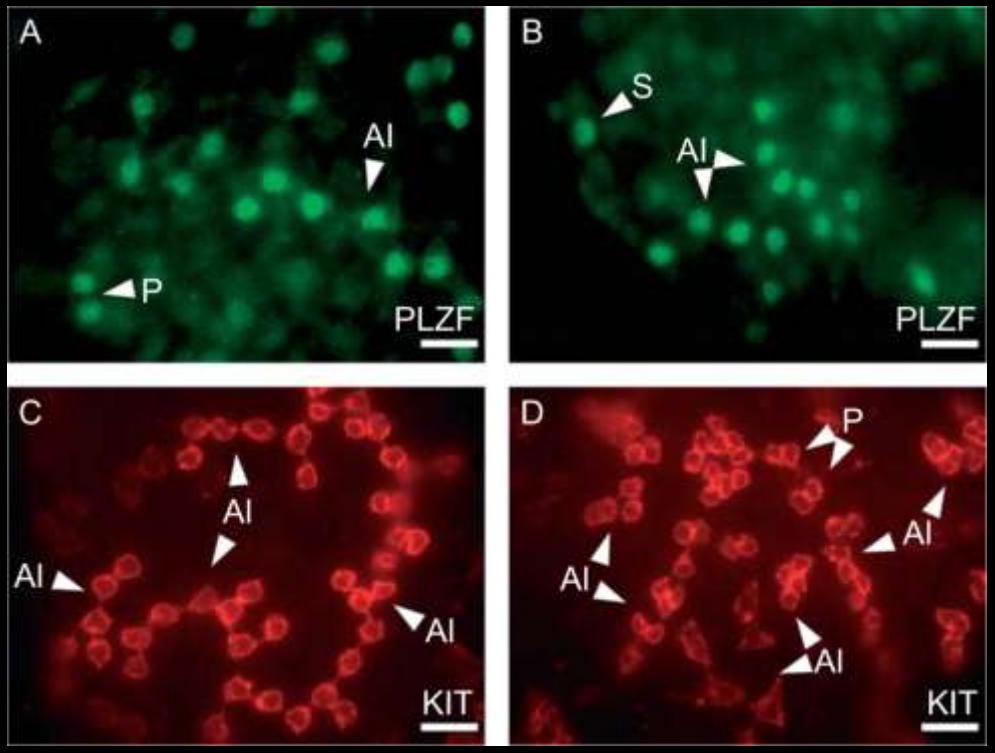
Белки		Клетки экспрессирующие белок (1)	Известные индукторы экспрессии	Гены-мишени + рег. / – рег. (2)	Начало экспрессии, (дпр) (3)	Возраст нокаутированных мышей к моменту полной остановки сперматогенеза	Ссылки
Сокращ. название	Полное название / класс						
Белки, инициирующие вступление ССК в дифференцировку							
Notch-1	Notch-1 / поверхностный рецептор	СГ, СП, ОС, УС	Нет данных	Нет данных	–6	Нет данных	Dirami *et al.*, 2001 Hayashi *et al.*, 2001 Mori *et al.*, 2003
Jagged-1	Jagged-1 / поверхностный белок	КС	ФСГ	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Dirami *et al.*, 2001
SOX-3	Sry-related HMG box-3 / Фактор транскрипции	A_s, A_{pr}, A_{al}	Нет данных	*ngn3 / oct-4*	–7	2 нед	Raverot *et al.*, 2005
Ngn3	Neurogenin3 / фактор транскрипции	A_s, A_{pr}, A_{al}	Sohlh1, SOX-3	Нет данных	–5		Yoshida *et al.*, 2004
Белки, поддерживающие трансформацию сперматогониев A_{al} в сперматогонии A_1							
SCF	stem cell factor / фактор роста	КС	ФСГ	*cyclin D3, Tert, bcl-w, bcl-xl / bcl-2*	1	Нет блока сперматогенеза к 8 мес	Mauduit *et al.*, 1999 Yan *et al.*, 2000
c-Kit	tyrosine-kinase receptor / поверхностный рецептор	КЛ, A_{al}, A_{1-4}, In, B	BMP4, Sohlh1	*cyclin D3, Tert, bcl-w, bcl-xl / bcl-2*	1	Нет данных	Feng *et al.*, 2000 Dolci *et al.*, 2002
BMP4	bone morphogenetic protein 4 / фактор роста	КС, СП, ОС	Нет данных	*c-kit*	1	Нет данных	Pellegrini *et al.*, 2003
Dazl	deleted in azoospermia like / РНК связывающий белок	СГ, СП	ERM	*sycp3, hspa2, calm2, Mvh*	1	Уже на 9 день в канальцах присутствуют только СГ	Schrans-Stassen *et al.*, 2001 Collier et al., 2005 Reynolds et al., 2005
Sohlh-1	spermatogenesis and oogenesis specific basic helix-loop-helix (bHLH)-1 / фактор транскрипции	A_{al}, A_{1-4}, In, B	Нет данных	*ngn3, c-kit, lhx8, crabp1 / Sox-30, sycp2*	–1	7 нед	Ballow *et al.*, 2006

(1) Включены данные только по *клеткам Лейдига (КЛ), клеткам Сертоли (КС), сперматогониям всех типов (СГ), сперматоцитам (СЦ), округлым (ОС)* и *удлиняющимся (УС) сперматидам*.

(2) Приведены данные по изменению экспрессии генов в *ССК* и *клетках Сертоли* у нокаутированных мышей и в культурах клеток, +рег. – гены, экспрессия которых регулируется белком на повышение, *–рег.* – гены, экспрессия которых подавляется белком.

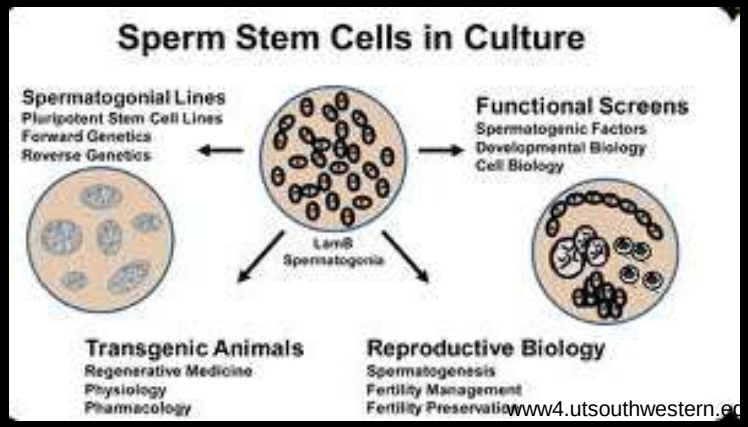
(3) Начало синтеза белка в постнатальный период, *дпр* – дни после рождения.

(4) Брайдиш-Столле и соавт. (Braydich-Stolle et al., 2007) показали GDNF-зависимую экспрессию Erm в недифференцированных сперматогониях в условиях клеточной культуры, тем не менее, эти данные не были подтверждены достаточно убедительно in vivo. В исследовании Чена и соавт. (Chen et al., 2005) экспрессия этого транскрипционного фактора была показана только в зрелых клетках Сертоли.



Clonal organization of undifferentiated and differentiating spermatogonia in adult rhesus seminiferous tubules.

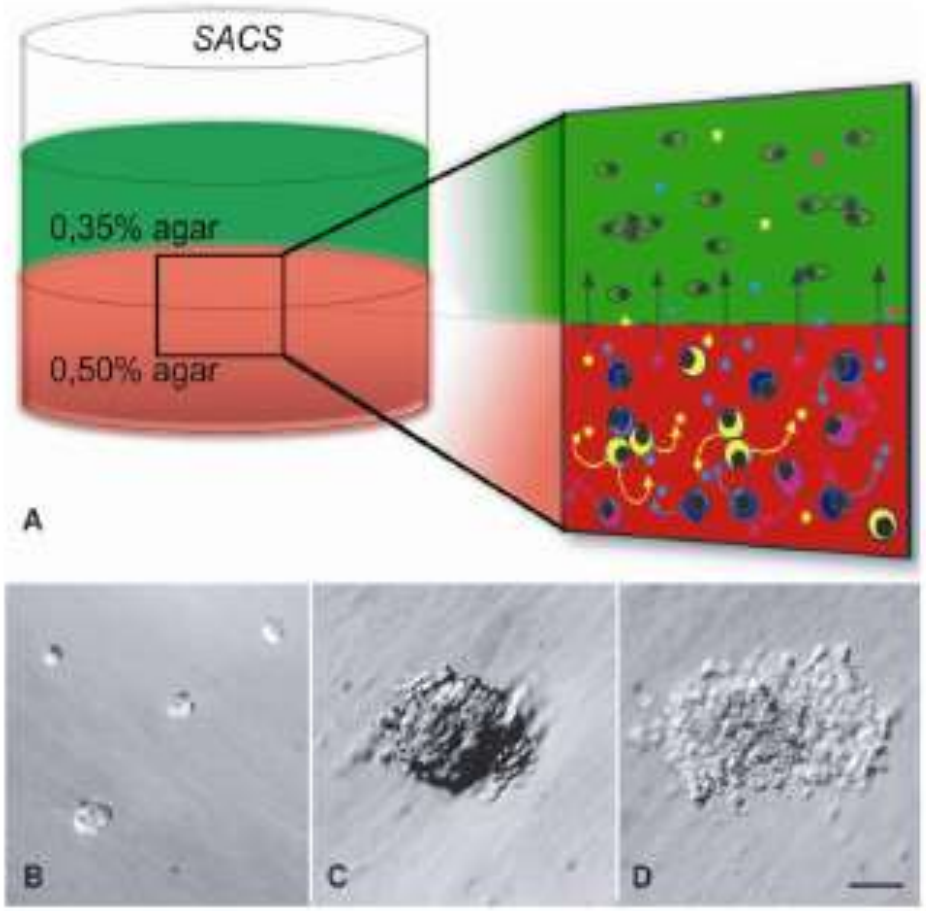
Hermann B P et al. Reproduction 2010;139:479-493 Published by BioScientifica



Итак, ***ССК*** и другие типы ***сперматогониев*** – очень важные клетки. В последнюю декаду интерес к их биологии и генетики со стороны специалистов, занимающихся проблемами андрологии и репродуктивных технологий, сильно возрос в связи с разработкой новых подходов, позволяющих изолировать, культивировать и трансплантировать недифференцированные половые клетки.

Успехи в исследованиях дадут ключи к преодолению мужской стерильности, разработкам стратегии мужской контрацепции, снижению генетического и репродуктивного рисков для молодых людей, страдавших онкологическими заболеваниями и излечившихся от этого страшного недуга, а также производству трансгенных животных, сохранению редких, исчезающих видов.

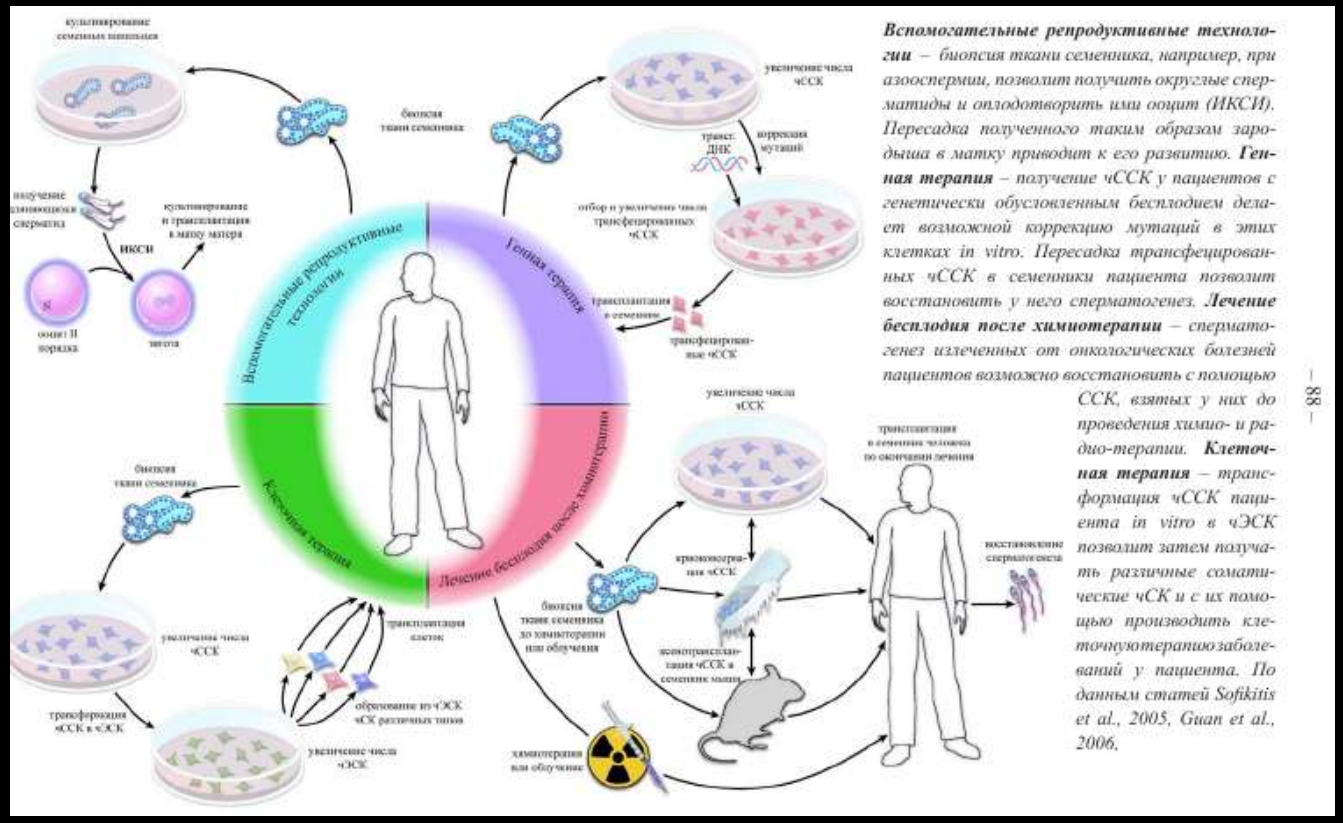
Schematic illustration of the Soft-Agar-Culture-System (SACS).



The two phases (gel phase (0.35% agar; green) and solid phase (0.5% agar; red)) are shown in higher magnification on the right side. Soluble factors (e.g. stem cell factor (SCF); stars) produced by ***supporting cells*** *(circles) in the solid phase diffuse through the solid into the gel phase (arrows). Cultured cells (ovals) in the gel phase absorb these factors without direct physical cell-cell contact between germ and somatic cells and differentiate. Images of clonal expansion of SAC-cultured* ***spermatogonia*** *after different culture periods (B (day 0), C (day 3), D (day 30)) found in the gel phase. Scale bar = 25 µm.*

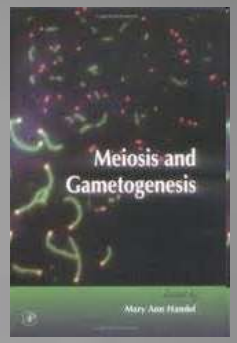
J. Wistuba et al. Mammalian Spermatogenesis
Functional Development and Embryology ©2007 Global Science Books

Подобно стволовым клеткам гематопоэтической системы ***сперматогониальные стволовые клетки*** (***ССК***) млекопитающих трансплантабельны: они могут наращивать собственный пул и регенерировать линию сперматогенных клеток. Также подобно эпидермальным и кроветворным ***стволовым клеткам*** ***ССК*** экспрессируют β_1-интегрин.



Согласно точки зрения некоторых ученых, культуры, например, ***сперматогониальных стволовых клеток***, выделенных из гонад человека (***чССК***), могут стать потенциальным источником так называемых мультипотентных стволовых клеток, которые можно будет использовать для клеточной терапии. К несомненным достоинствам этого источника относятся легкость его получения (биопсия семенников), отсутствие иммунологических проблем при трансплантациях (***ССК***) могут браться у самого пациента), а также разрешение этических вопросов, поскольку работа с эмбрионами в данном случае исключена.

Важным переломным моментом в развитии мужских половых клеток является завершение или сперматогониальных делений



и

переход в качественно новый период развития – в так называемый период роста или мейоз.

Мейоз – важное звено в сложной цепи развития половых клеток.

videos.pakdawn.com

МЕЙОЗ: ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС.

Meiosis

During **meiosis**, a parent cell divides into four sex cells each with half the number of chromosomes. Sex cells of males are called **sperm cells** and **egg cells** of females.

Before Meiosis

Meiosis I

Meiosis II

1 Before meiosis begins, chromosomes in the parent cell are copied.

2 Chromosome pairs line up in the middle of the cell.

3 The chromosome pairs split and pull apart to opposite ends of the cell.

4 Each of the two new cells formed has half the number of chromosomes.

5 Chromosome pairs line up in the middle of the cell.

6 The centromeres split and the single chromosomes move apart to opposite ends of the cell.

7 Four sex cells are produced each with only one chromosome from each original pair.

Meiosis Punnett Square

A **Punnett Square** shows all the possible allele (gene) combinations in the offspring of two organisms.

male parent: Rr → R, r

female parent: Rr → R, r

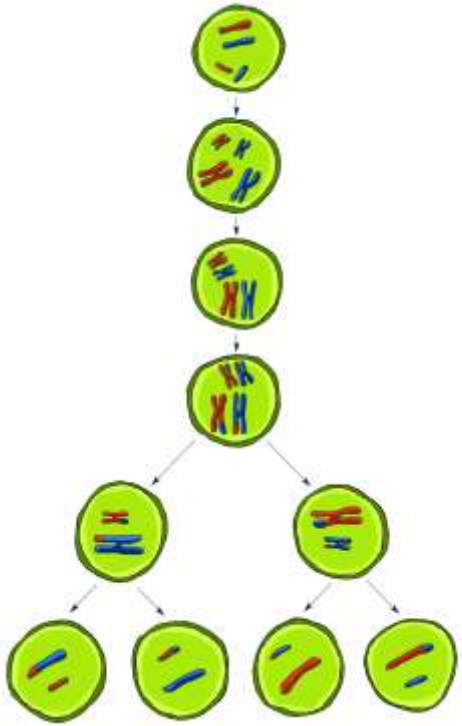
	R	r
R	RR	Rr
r	Rr	rr

Mitotic cell

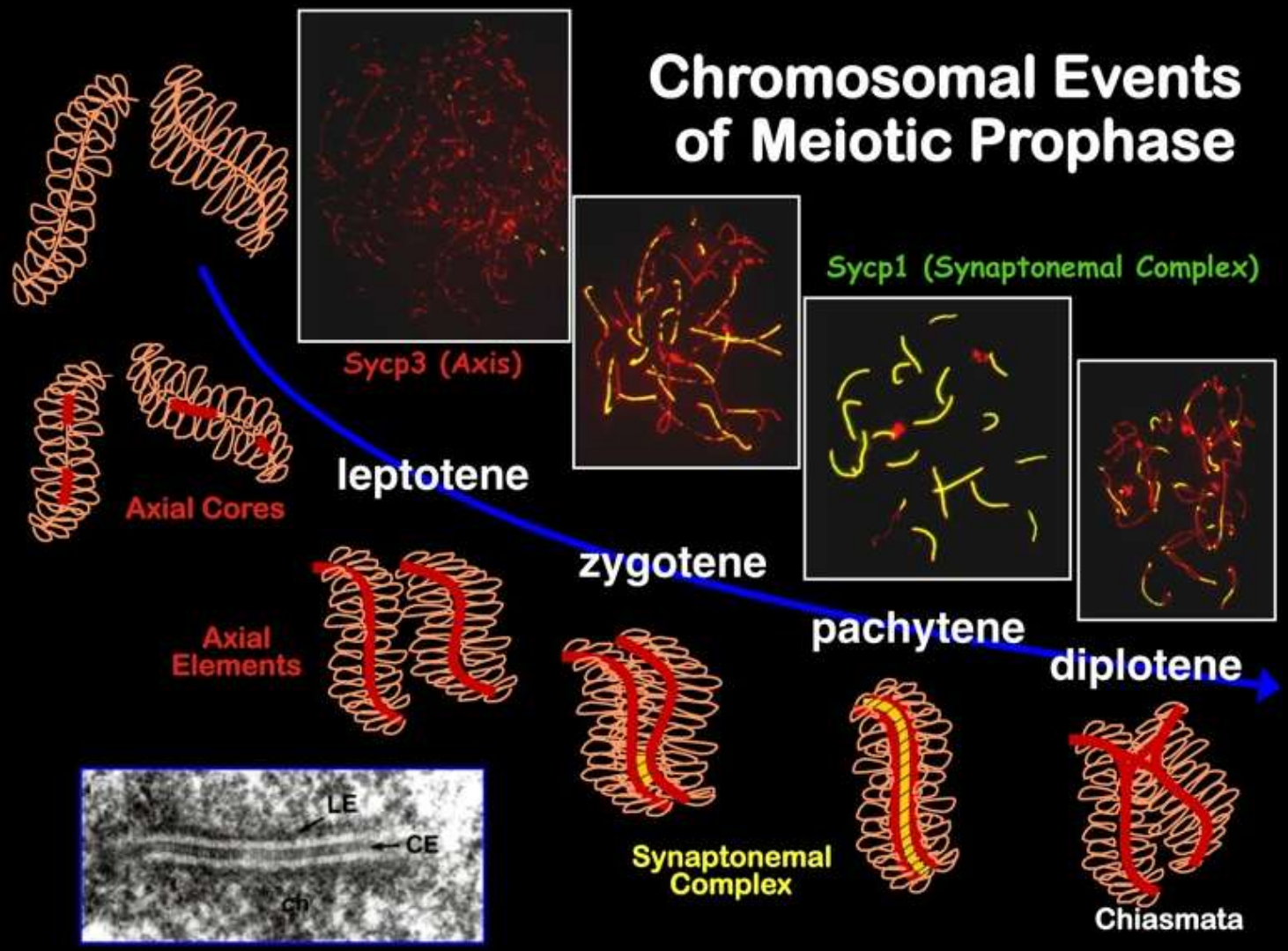
A cell preparing to undergo division. Notice the dense chromatin.

NEWPATH LEARNING.

© Copyright NewPath Learning. All Rights Reserved. 94-4702
www.newpathlearning.com



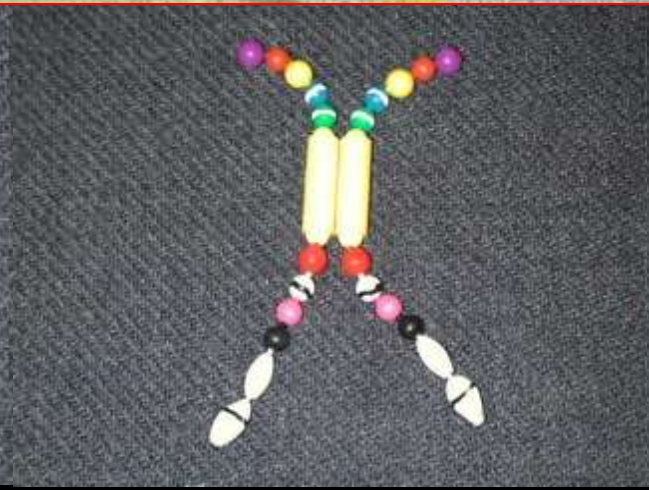
МЕЙОЗ: ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕСС.



www.bluesports.co.uk

Meiosis

pair of chromosomes diploid



replicated chromosome two chromatids

chromosome pair before crossing over

chromosomes during crossing over

chromosome pair after crossing over

single chromosome in gamete haploid

biology.northwestcollege.edu

sciweb.hfcc.edu/Kelly/classes/bio

Прелептотена-лептотена. Минимум спирализации. Максимальный репликативный синтез ДНК. Хромосомные, аутокаталитические матрицы открыты, неустойчивы и чрезвычайно чувствительны к внутренним диссонансам или любым помехам извне. Сетчатая структура хроматина переходит в состояние отдельных длинных тонких, теперь уже двойных хромосомных нитей. Теломерными концами они ориентированы в один район ядерной мембраны. Притяжение между хромосомными нитями отсутствует.

Зиготена. Начало сближения или конъюгация гомологичных хромосом по типу застежки-молнии. Образование бивалентов. Формирование синаптонемного комплекса. Хромосомы собираются на одном из полюсов ядра в виде букета. Репликация небольшого количества (0.3% от общего генома) неспецифичной зигДНК, но не зигРНК.

Пахитена (самая продолжительная по времени стадия мейоза и сперматогенеза). Полное сближение гомологичных хромосом по всей их длине. Каждая нить теперь представляет собой бивалент. Прогрессивное укорочение и утолщение хромосом. Появление хиазм. Незначительный репаративный синтез ДНК. Внеплановый синтез ДНК.

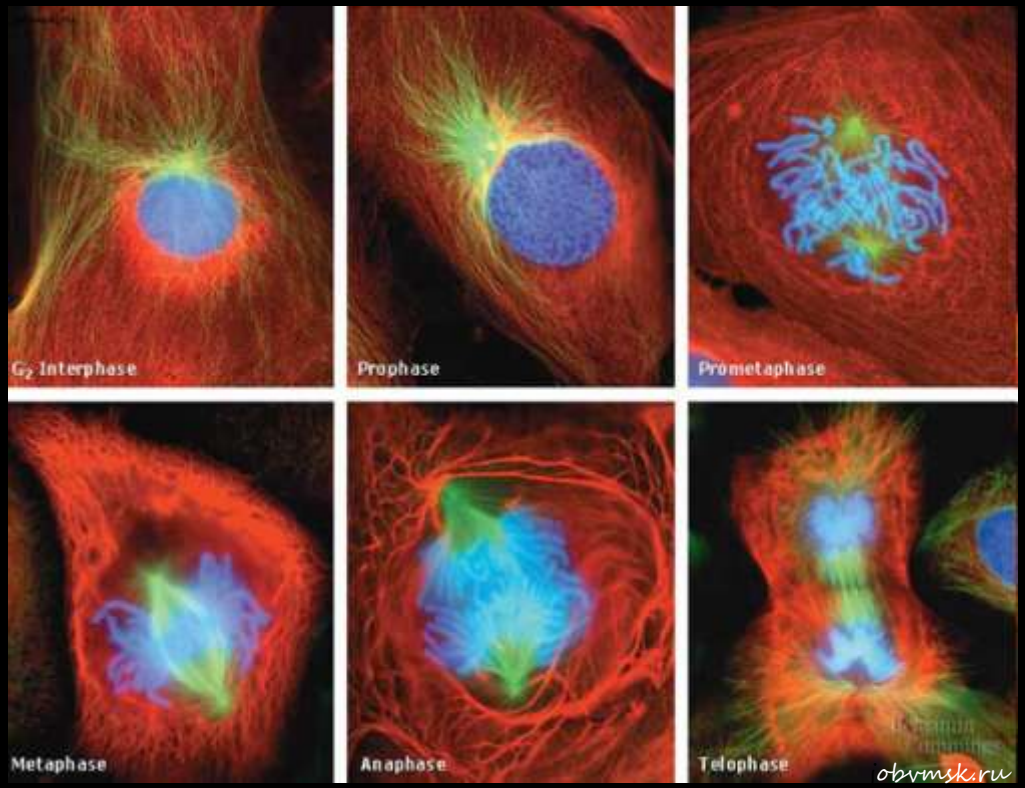
Диплотена. Доминирование сил отталкивания, вследствие чего образуются хиазмы - физическое проявление происходящего обмена гомологичными участками хромосом.

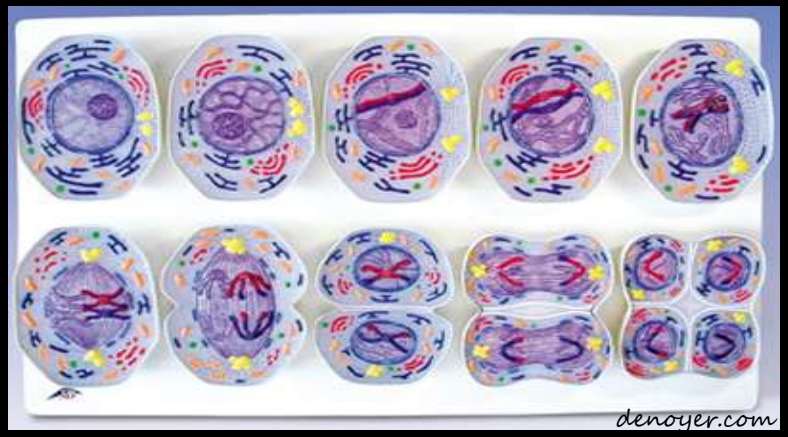
Диакинез. Сильное укорочение и утолщение хромосом за счет их максимальной спирализации. Биваленты приобретают форму двойных палочек, гантелей, крестов, восьмерок. Ядрышко исчезает. Ядерная оболочка исчезает. Период роста завершается.

Метафаза. Здесь генетическая система половых клеток достигает самой высокой степени конденсации.

Важным фактором, инициирующим выход клеток из G**2**-фазы и входа в фазу деления, является так называемый MPF - фактор, запускающий метафазу. Активация MPF инициирует каскад событий, приводящих к разрушению ядерной мембраны, хромосомной конденсации, линейному выстраиванию парных бивалентов на веретене деления. (Последние данные свидетельствуют о том, что данный фактор состоит из циклин-зависимой киназы I (CDK1) и регуляторной субъединицы циклин B (CCNB1).

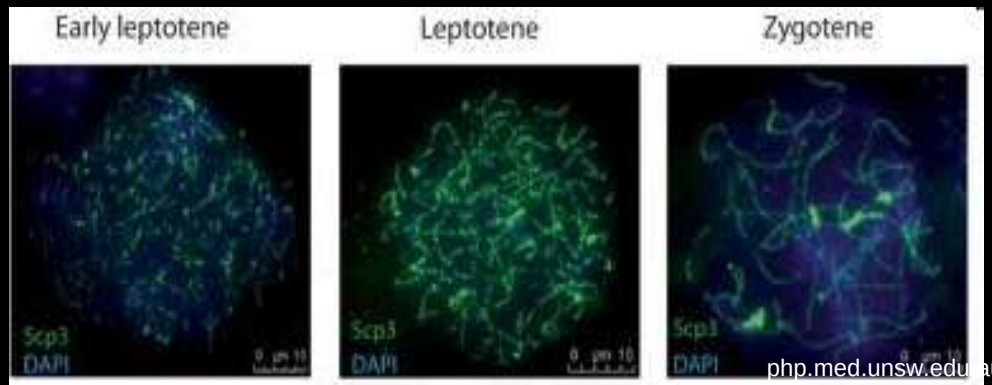
Мейоциты на разных стадиях развития





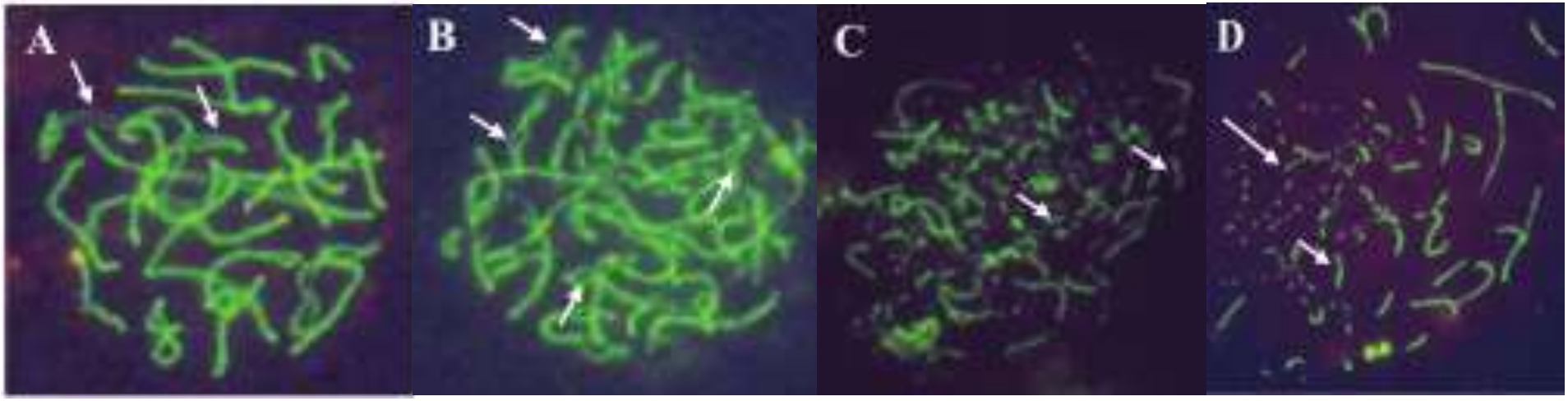
The 10 stages in the reduction division of the meiosis of a typical mammalian germ cell are included: ***interphase*** **(stage of G1-phase) · prophase I (*leptotene*) · prophase I (*zygotene and pachytene*) · prophase I (*diplotene*) prophase I (*diakinesis*) · *metaphase I* · *anaphase I* · *telophase I*, *cytokinesis I*, *interkinesis*, prophase II, and *metaphase II* · *anaphase II* · *telephase II* and *cytokinesis II.***

Products: Lab Investigations: Meiosis Model (Mag



php.med.unsw.edu.au

The four abnormalities the most frequently encountered at pachytene after immunostaining of the synaptonemal complexes (SC) by SCP3.

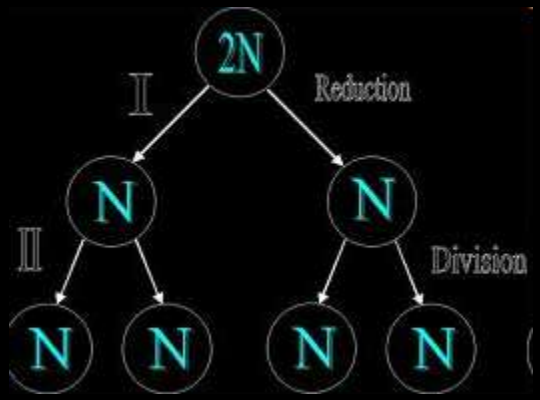


A-D: All the abnormalities are pointed by arrows. ***A***- asynapsis; ***B***- thin and irregularly stained **SC**; ***C***- fragmented **SC**, **XY** chromosomes are at substage 4 (arrow); ***D***- dotted **SC** (arrow); note the presence of fragmented **SC** in this nucleus.

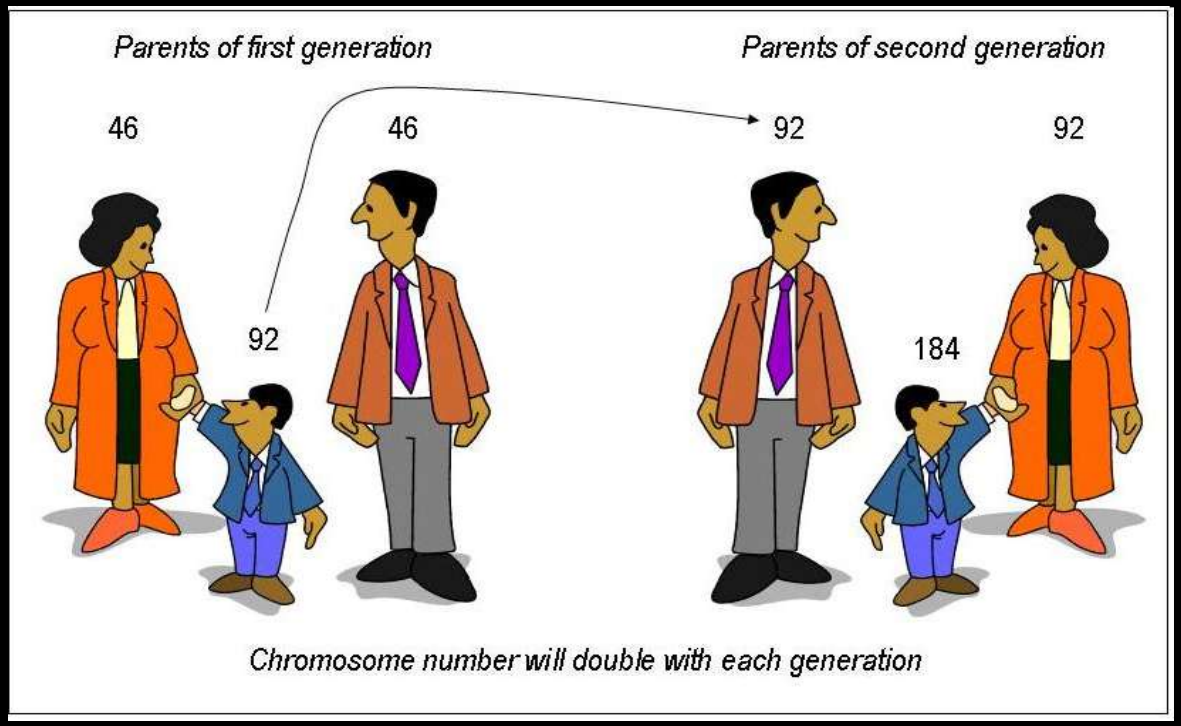
The accumulation of early ***primary spermatocytes*** is an indication that progression of meiosis is defective in spermatogenesis failures. The value of the ***PI*** (pachytene index: ***PI = P1 + P2 / P1 + P2 + P3 + P4****) less than 0.50 indicates that the kinetic of meiosis is normal at pachytene. There is no normal spermatogenesis when the frequency of one or several ***SC*** abnormalities is significantly higher than in controls and/ or when the ***PI*** is more than 0.50. * -***P1 + P2 / P1 + P2 + P3 + P4 – substages of pachytene.***

Virginie Tassistro et al., Indian J Med Res 129, March 2009, pp 268-278

Если бы не мейоз,



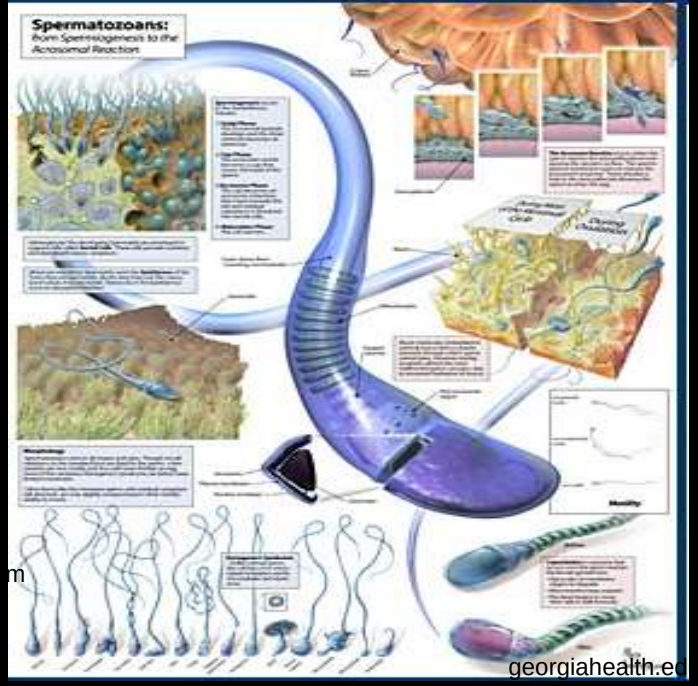
то



brincotoys.com
geneticssuite.net

packopedia.i

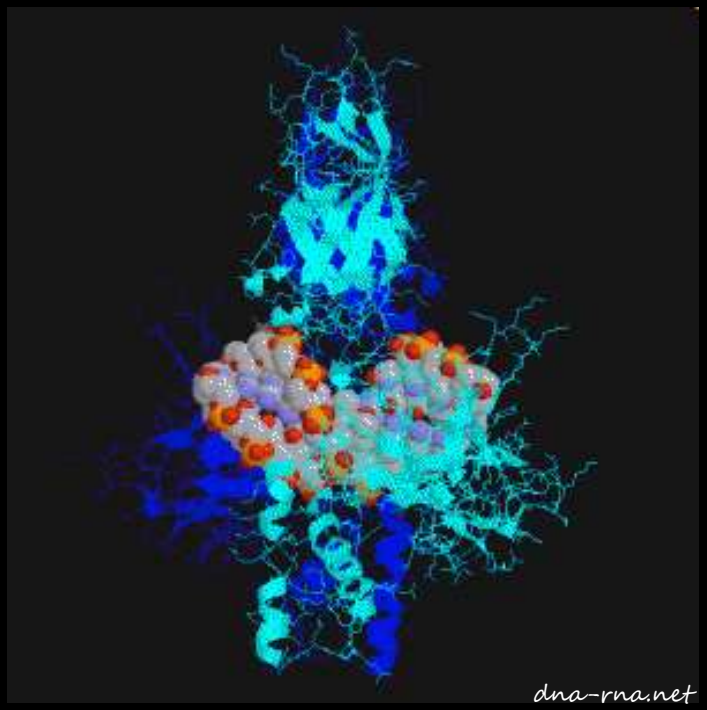
www.visualphotos.com



georgiahealth.ed

Продуктивность сперматогенеза во многом зависит от степени цитогенетической стабильности мейоза как сложного биологического процесса.

Конфигурационные, ступенчатые переходы хромосом в мейозе сопровождаются уникальными макромолекулярными процессами

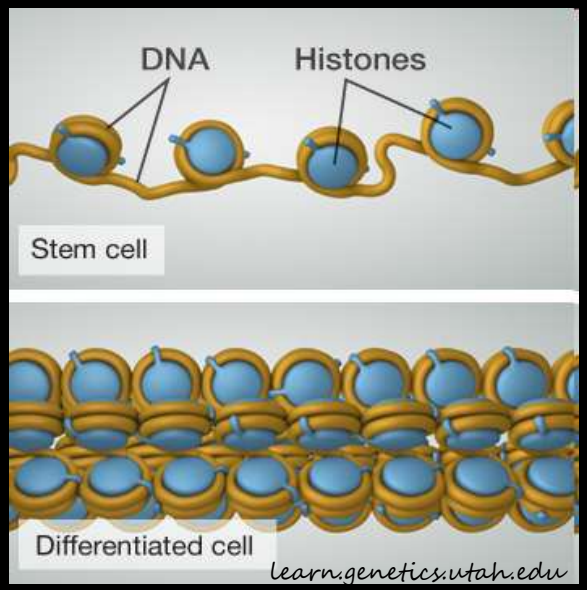


Синтез РНК в мейотических клетках идет на протяжении всей профазы I мейоза.

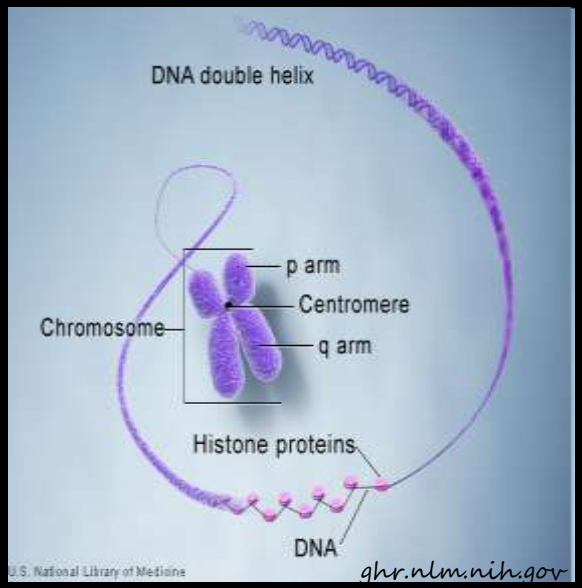
При этом подобно тому, как в оогенезе синтезируются информационные молекулы РНК, необходимые в дальнейшем для развития зародышей, так и в мейоцитах сперматогенного ряда часть транскрибируемой ***РНК*** запасается в виде долгоживущих матриц. Эти ***иРНК*** реализуются на постмейотических стадиях развития. После соединения с рибосомными матрицами они дают начало синтезу спермиоспецифических белков, играющих важную роль в конденсации и стабилизации хроматина сперматид и спермиев, геном которых уже не активен.

Сам по себе этот факт не нов и отвечает одному из общих принципов онтогенеза, согласно которому в природе есть работа генов с "опережением".

То есть синтез тех матричных РНК, которые будут "нужны" (будут "работать") – как говорил ***Л.И.Корочкин*** - на стадиях развития, порою значительно более поздних.

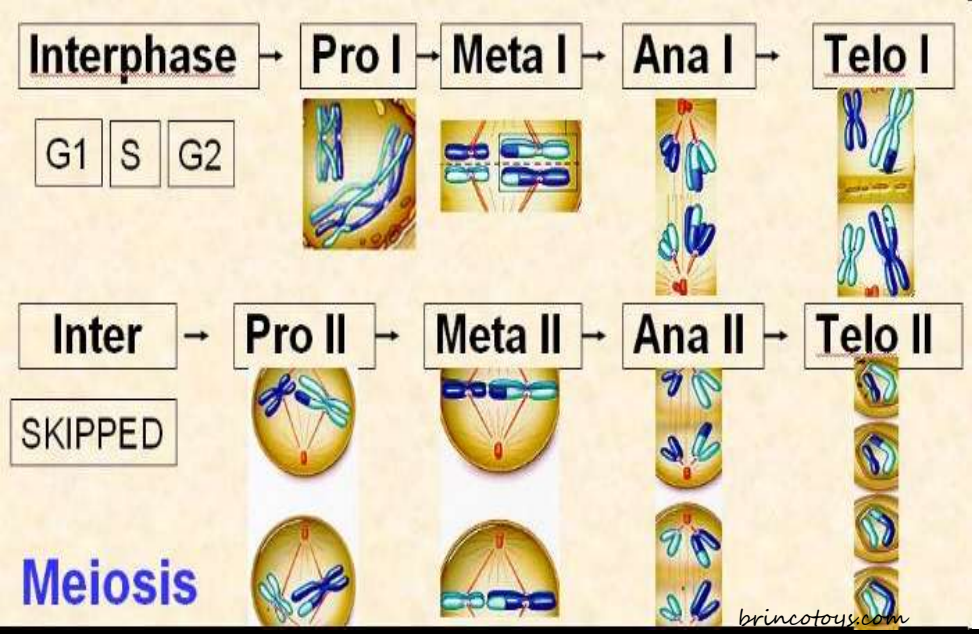


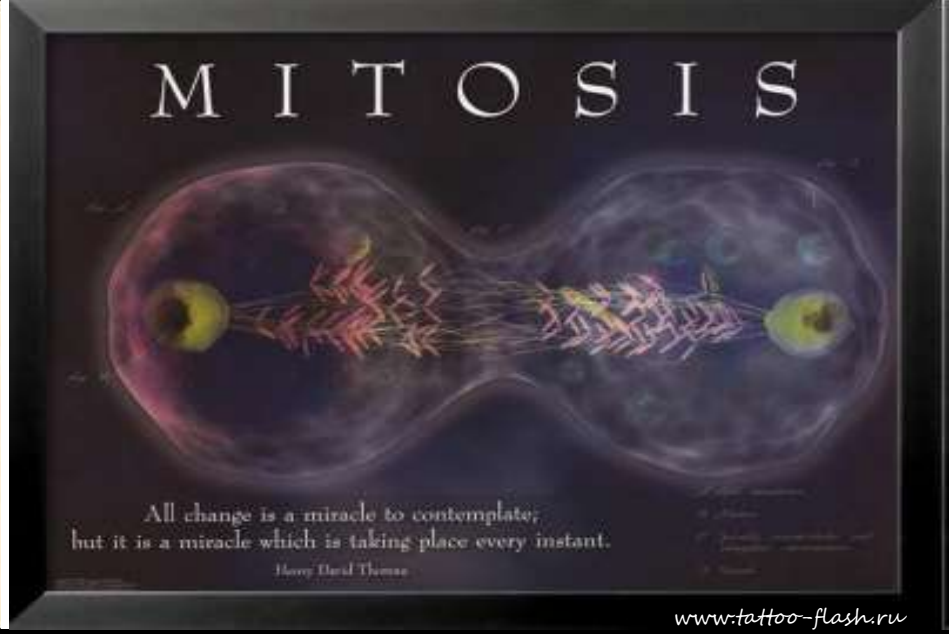
В профазе I мейоза синтезируются несколько фракций ***гистоновых белков***, биохимически отличающихся от ***основных ядерных белков*** в сперматогониальных и соматических клетках. Причем в мейозе синтезы ***ДНК*** и ***основных ядерных белков*** разобщены. Несмотря на то, что оба синтеза стартуют одновременно, синтез ***ДНК*** завершается на стадии лептотены, тогда как белковый синтез продолжается вплоть до стадии пахитены. Только на этой стадии достигается соотношение ***ДНК/белок*** равное 1.



Мейотические хромосомы различаются по чувствительности к действию мутагенов. Парадоксальна ситуация, когда генетически наиболее чувствительные прелептотенные и лептотенные сперматоциты после действия на них мутагенов, вызывающих широкий спектр генных и структурных мутаций, тем не менее, в массе своей сохраняют способность нормально преодолевать профазу I мейоза, деления созревания и трансформироваться в сперматиды и спермии.

О том, что клетки на стадиях прелептотены-лептотены проявляют высокую генетическую чувствительность, свидетельствует появление большого числа тестикулярных спермиев с морфологически аномальными головками на терминальных стадиях развития.





Ярким показателем расхождения между генетическими преобразованиями в соматических и половых клетках служит у вторых усложнение мейотического спектра преобразований и сложная цепь превращений половых клеток – от гониев до гамет (Рапопорт).

Мейотические клетки, в отличие от митотических, не циклируют. Но сразу после делений выходят в терминальную дифференцировку.

Другими словами, мейоз с его стадиями и фазами развития мужских половых клеток – это всего лишь один из этапов процесса полового размножения.

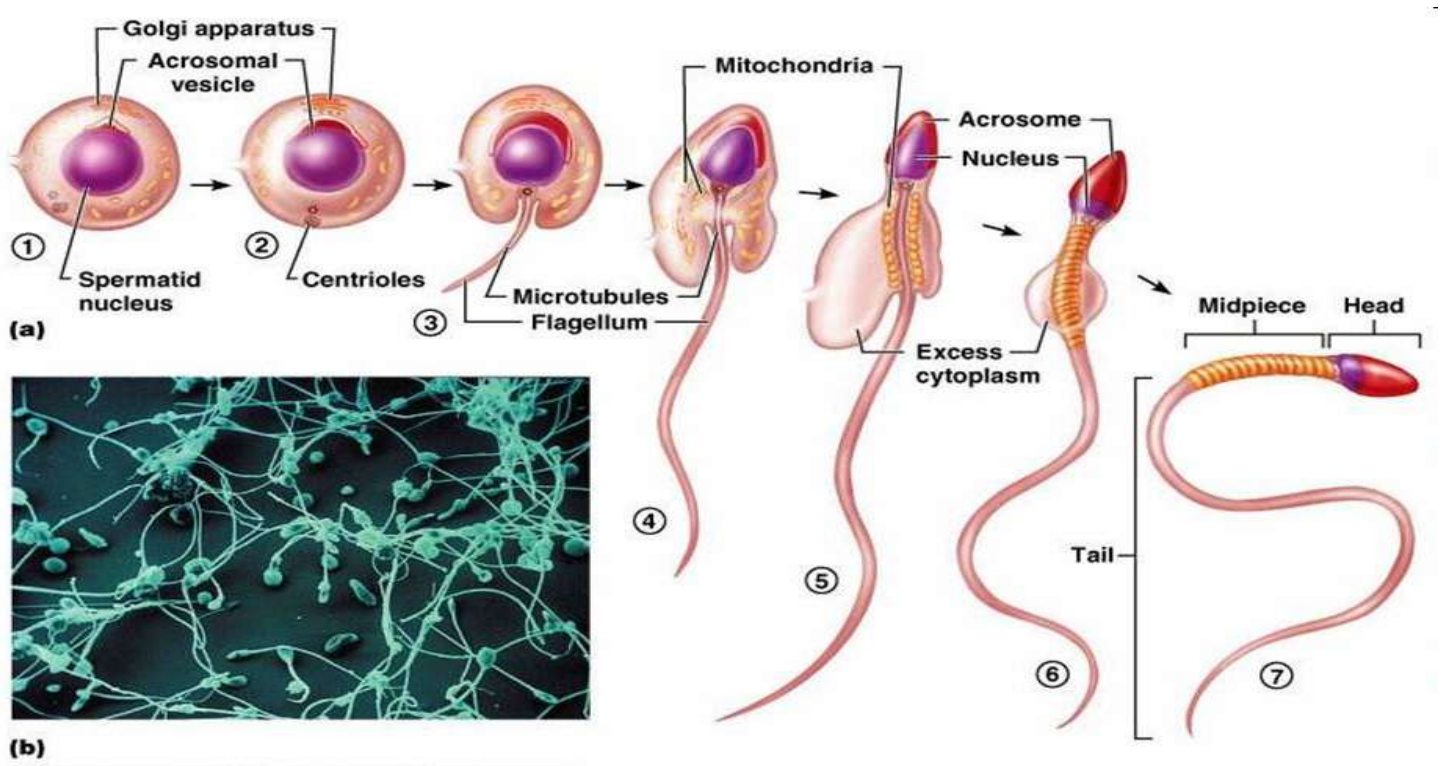
Вслед за мейозом следует

Сперминогенез –

процесс трансформации сперматид в спермии

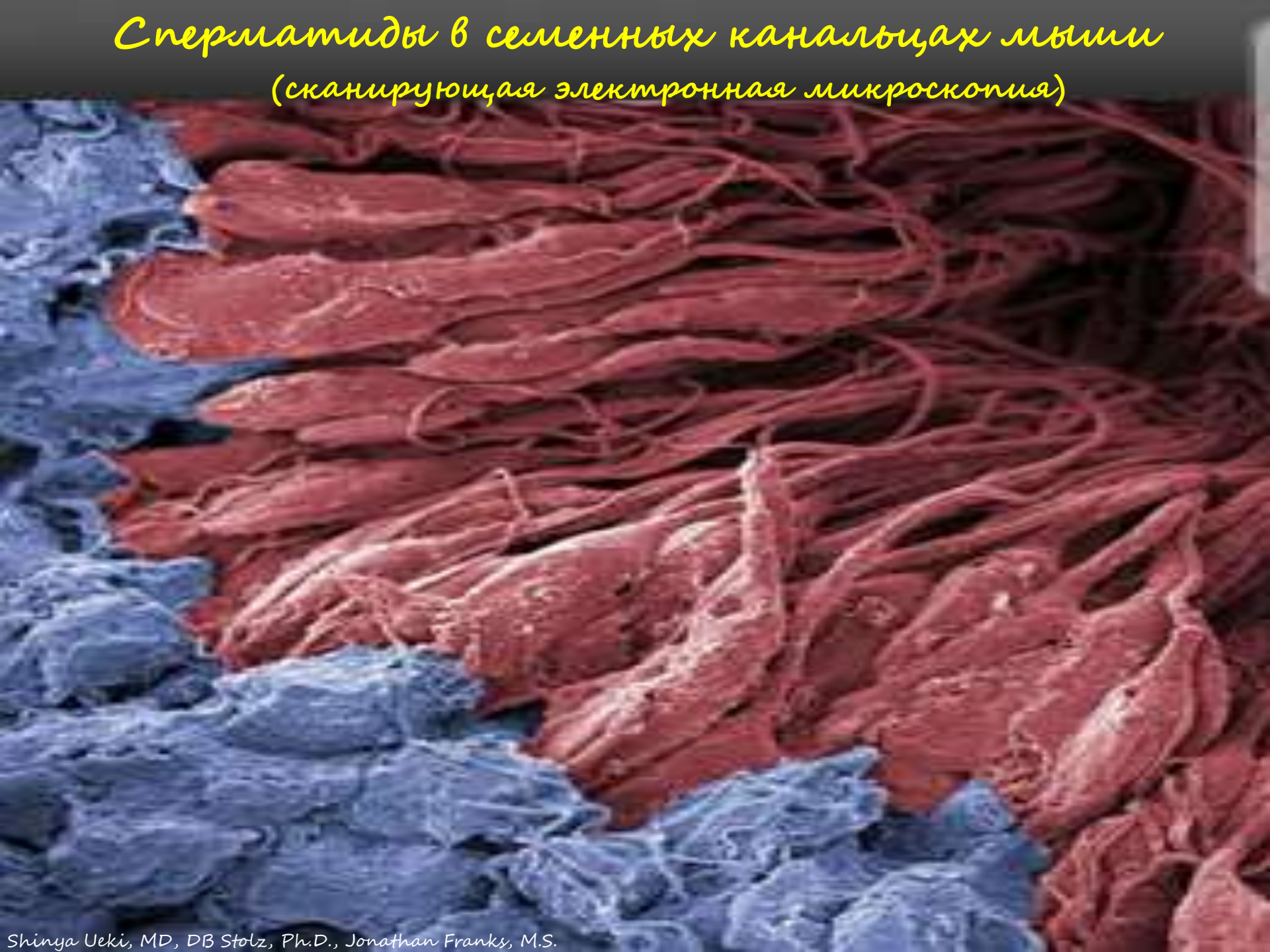
Процесс сперматогенеза сопровождается:

изменением структуры ядра;
конденсацией хроматина и постепенным выключением генома;
образованием акросомы;
формированием локомоторного аппарата;
сбрасыванием основной массы цитоплазмы;

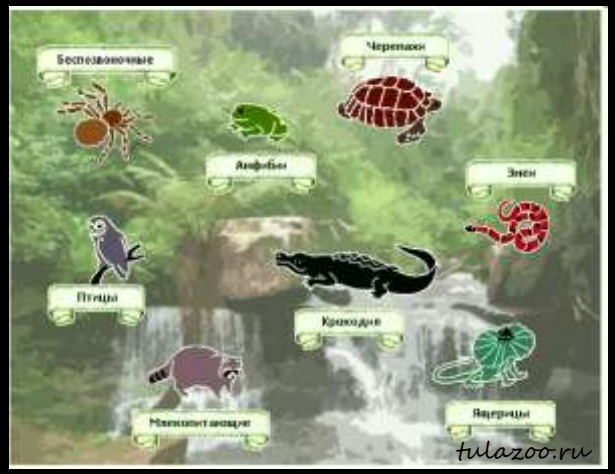


Сперматиды в семенных канальцах мыши

(сканирующая электронная микроскопия)

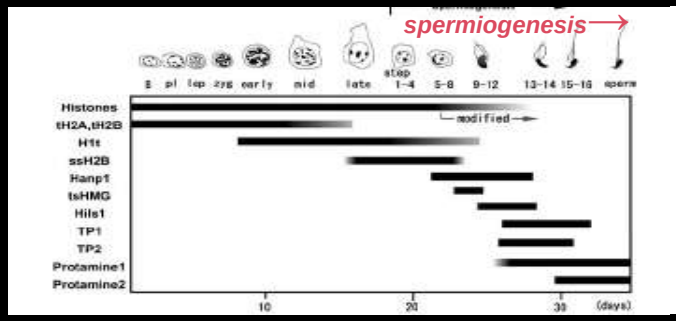


Shinya Ueki, MD, DB Stolz, Ph.D., Jonathan Franks, M.S.



У большого числа видов позвоночных и беспозвоночных животных с внутренним оплодотворением, когда спермии переносятся в половые пути самок непосредственно или в составе сперматофоров, в спермиогенезе на смену гистонам приходят протамины, протаминоподобные или промежуточные белки, которые могут приводить к большей компактизации ДНК в ДНП-комплексе, чем при нуклеосомной организации хроматина.

А это делает наследственный материал мужских гамет неуязвимым во время прохождения последних по сложным путям женского репродуктивного тракта.



Schematic representation of nucleoprotein expression in germ cells during mouse spermatogenesis. Bars indicate nucleoproteins that are thought to be involved in chromatin structuring. The onset of expression of the testis-specific histone variants ***tH2A***, ***tH2B***, ***H1t*** and ***ssH2B*** is also shown. ***tsHMG***, testis-specific high-mobility-group box protein; ***TP1*** and ***2***, ***transition proteins 1*** and ***2***.

H.Tanakaa and T.Babab, ,2005

Важнейшее значение для стабилизации и конденсации гаметического ДНП-комплекса имеют вновь синтезируемые в сперматогенных клетках богатые аргинином и цистеином высокоосновные, сперматоспецифические белки, постепенно вытесняющие «старые» гистоны соматического и мейотического типов или промежуточные сперматидные белки.

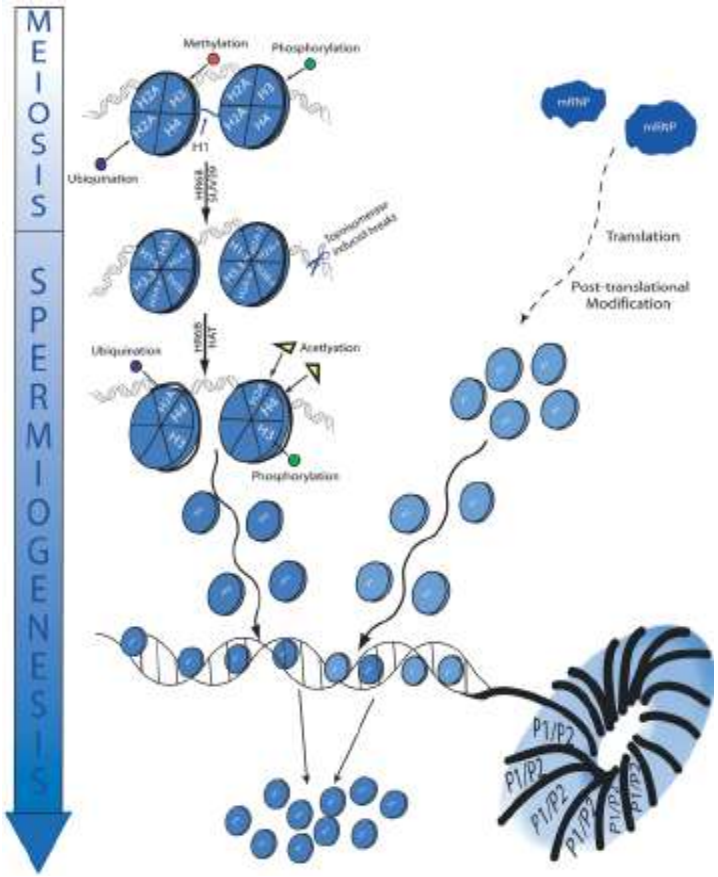
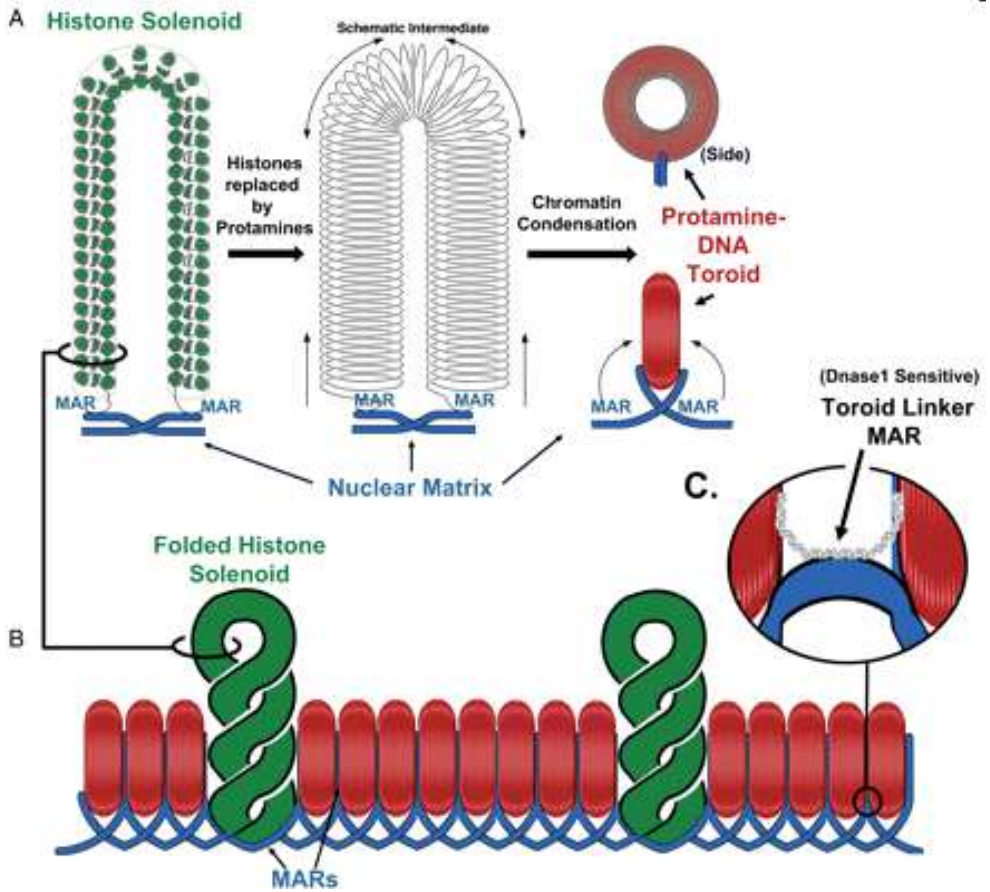


Diagram highlighting the key events in the transition of somatic histones to replacement by protamines. Somatic histones undergo site-specific methylation, phosphorylation and ubiquitination which facilitates their replacement by testis-specifichistones (t) during meiosis.Hyperacetylation of H4-t is akey factor in relaxation of the DNA coil to facilitate replacement of the testis-specific histones by the transition proteins, whereas topoisomerase 1 relieves torsional stress by causing double-strand breaks which are subsequently re-ligated. Protamines 1 and 2, processed from a pool of RNP particles, undergo maturation before and during binding to the DNA and replacemnt of the transition proteins. HR6B, ubiquitin-conjugating enzyme E2B (UBE2B) (RAD6 homolog); HAT, histone acetyltransferase; Suv39, H3 Lys 9 histone methyltransferase.

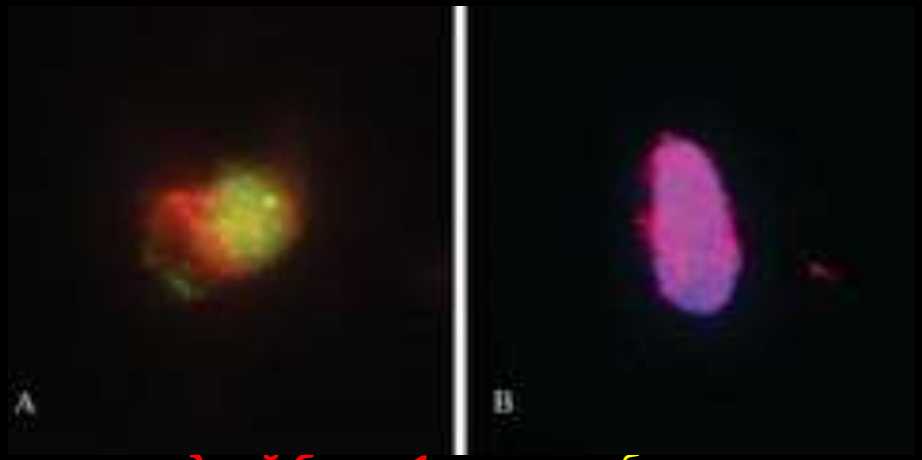
D. T.Carrell et al.,HumanReproductionUpdate, pp. 1–15, 2007



Three major structural elements of sperm chromatin.

(***A***) During spermiogenesis, histones are replaced by protamines, condensing the DNA into tightly packaged toroids. Each protamine toroid is a loop domain (part A of this figure is modified from a similar figure published in Ward, 1993). (***B***) Protamine toroids may be organized by stacking side to side. Recent evidence suggests that some large tracts of DNA retain histone (green solenoid). These may be entire loop domains that are not condensed by protamines. (***C***) The DNA strands that link the protamine toroids are nuclease sensitive, and may be bound to histones, as well. ***MAR***, matrix attachment region

Локализация переходного белка 1 и спермиоспецифического, протаминоподобного белка 1 в округлых и удлиняющихся сперматидах с помощью флуоресцентной микроскопии.

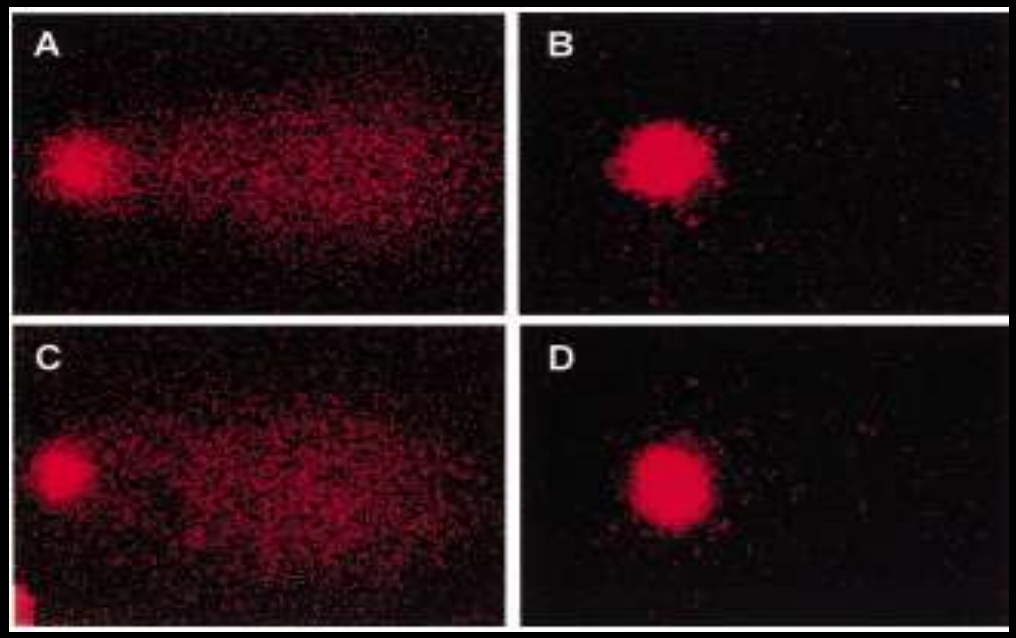


(A) В округлых сперматидах ***переходный белок 1*** можно наблюдать непосредственно в ядре (зеленая флуоресценция) и ***протаминоподобный белок 1***, расположенный в цитоплазме (красная флуоресценция).(B) В ядрах удлиняющихся сперматид ***переходный белок 1*** не выявлялся, тогда как ***протаминоподобный белок 1*** полностью заполнил ядро (красная флуоресценция).

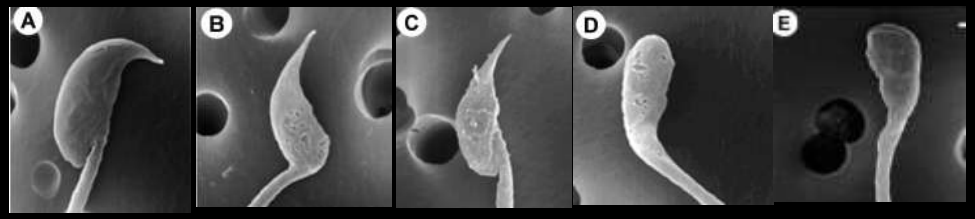
Most patients with abnormal protamine protein levels have elevated levels of protamine transcript in the mature sperm cell, indicating a possible defect in transcription or translation. The regulation of protamine expression is unique and includes several possible mechanisms which may be responsible for dysregulation of protamine expression and concurrent broad spectrum defects in spermatogenesis. We suggest two hypotheses: (i) that abnormal protamine expressionis indicative of a generalized defect in mRNA storage and/on translation which affects other mRNA transcripts or (ii) that protamines may act as a checkpoint of spermatogenesis.

D. T.Carrell et al.,HumanReproductionUpdate, pp. 1–15, 2007

Дефицит по содержанию, например, протаминоподобного белка 2 (PRM2) приводит к повреждениям структуры головок сперматозоидов у мышей, а в дальнейшем и к гибели эмбрионов.



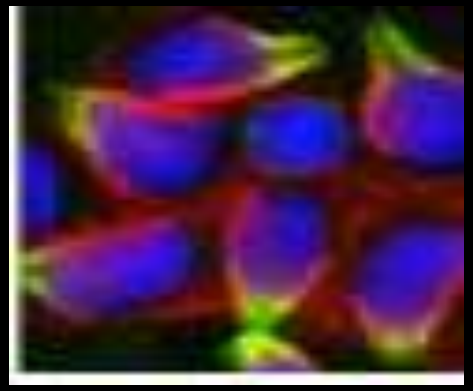
Comet assay of DNA integrity in nuclei of sperm. Sperm were from a chimera producing 100%wild-type sperm (C57BL/6 genotype) (***B***, ***D***) and a chimera producing 70%PRM2-deficient sperm (129 genotype) (***A***, ***C***). The presence of a comet tail in ***A*** and ***C*** indicates that fragmented DNA was present in these cells. ***A***, ***B***) Intact sperm. ***C***, ***D***) Sonicated sperm. Original magnification x200.



Scanning electron micrographs of sperm from wild-type and ***Prm2*** chimera mice. Sperm shown are from a wild-type mouse (*A, norm*) and a chimera producing 90% PRM2-deficient sperm (*B–E, abnormal*).

Chunghee Cho et al., BIOLOGYOF REPRODUCTION69, 211–217 (2003

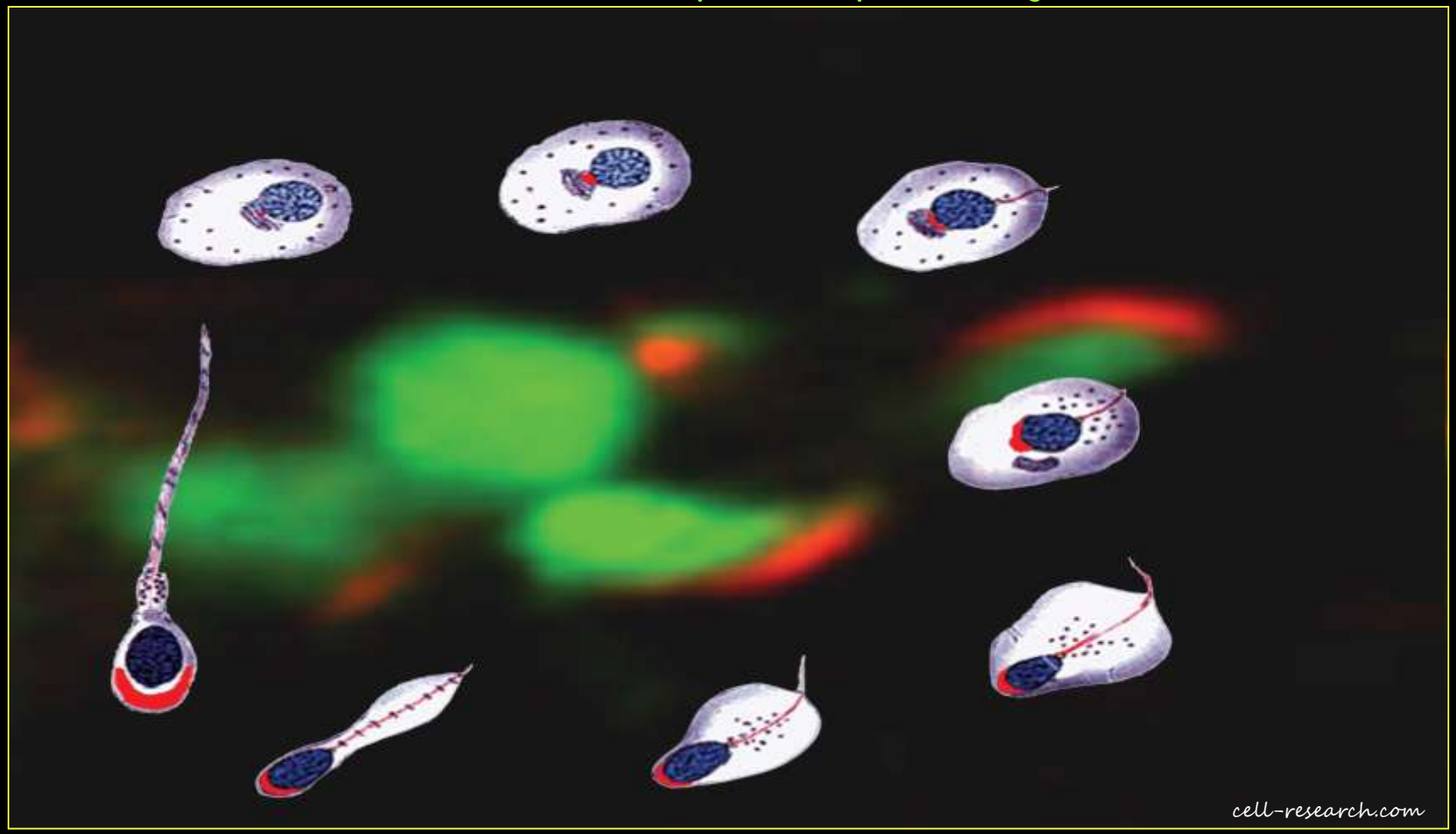
During spermiogenesis (the final stage of sperm production), elongation, nuclear reshaping and other morphological changes convert round spermatids into motile sperm. But what controls spermiogenesis?



Zhou and colleagues report that the novel, conserved protein *RIM-BP3* (a member of a family of multidomain proteins that probably function a adaptors during vesicle fusion and release) is essential for spermiogenesis in mice. The researchers show that *RIM-BP3* is a testis-specific protein and that its expression is associated with the manchette, and that its expression is associated with the manchette, a transient microtubular structure that is required for spermatid morphogenesis. Targeted deletion of RIM-BP3, they report, causes the production of sperm with abnormal heads and male infertility. They also report that *RIM-BP3* interacts with *Hook1* (another manchette-associated protein involved in sperm head morphogenesis) and suggest that this interaction might correctly position the manchette. Because infertility in male mammals is often associated with the production of sperm with abnormal heads, these results suggest that dysfunctions in the pathways that involve RIM-BP3 might underlie some forms of human male infertility.

Development, 2009, 136, e301.

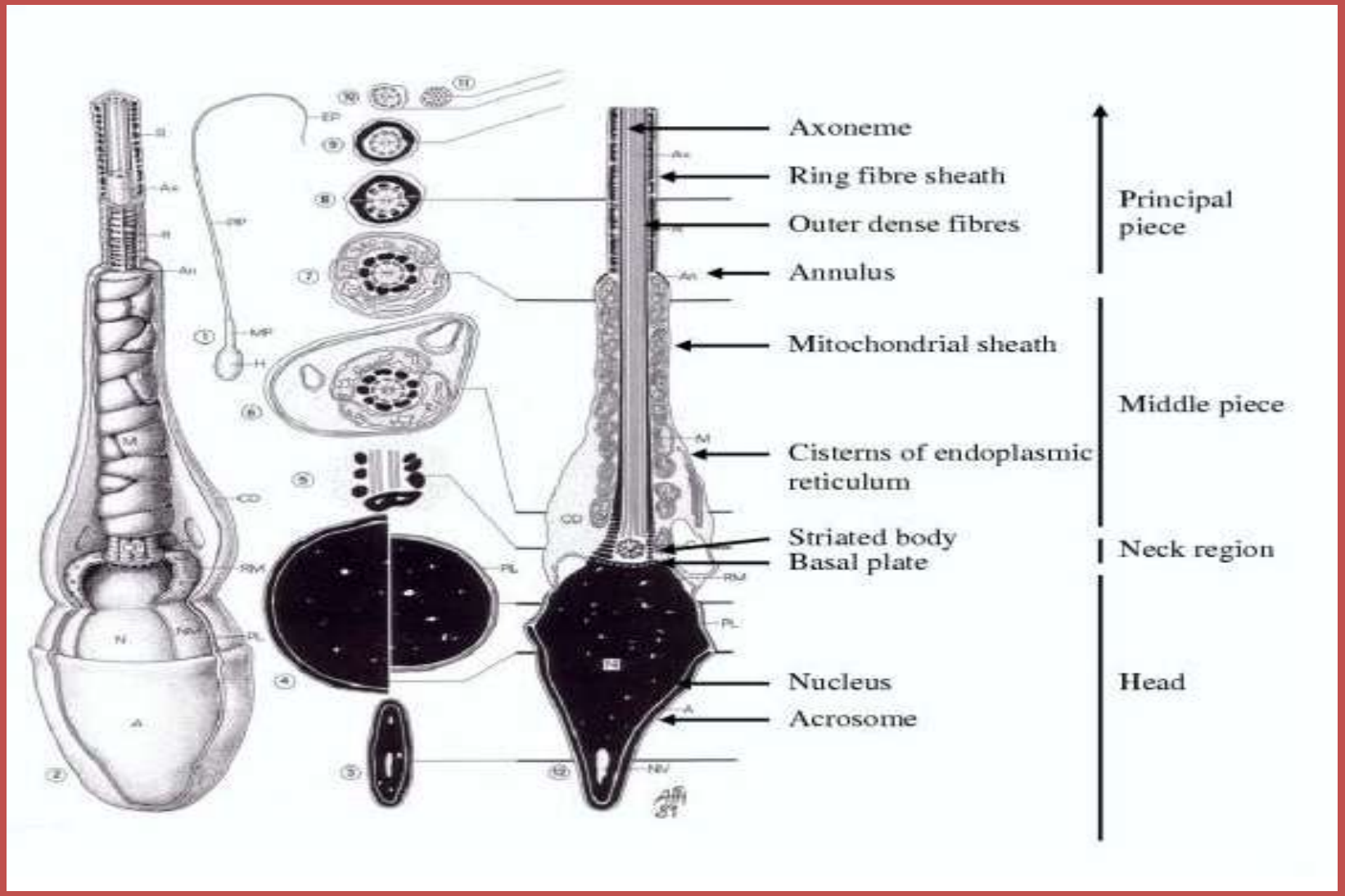
The cover shows a sperm protein designated as ***rtSH3p13*** (red fluorescence labeled) was located in acrosome region of germ cells in various steps in spermiogenesis.



The ***rtSH3p13*** protein was further proved to be involved in clathrin-mediated vesicular traffic in germ cells and may function in acrosome biogenesis. The surrounding schematic diagram shows the process of acrosome biogenesis during spermiogenesis, by which spermatids mature into sperm cells (Y. Qiao et al., 2004).

Молекулярно-биологические процессы, протекающие на разных стадиях сперматогенеза

Организация сперматозоида человека



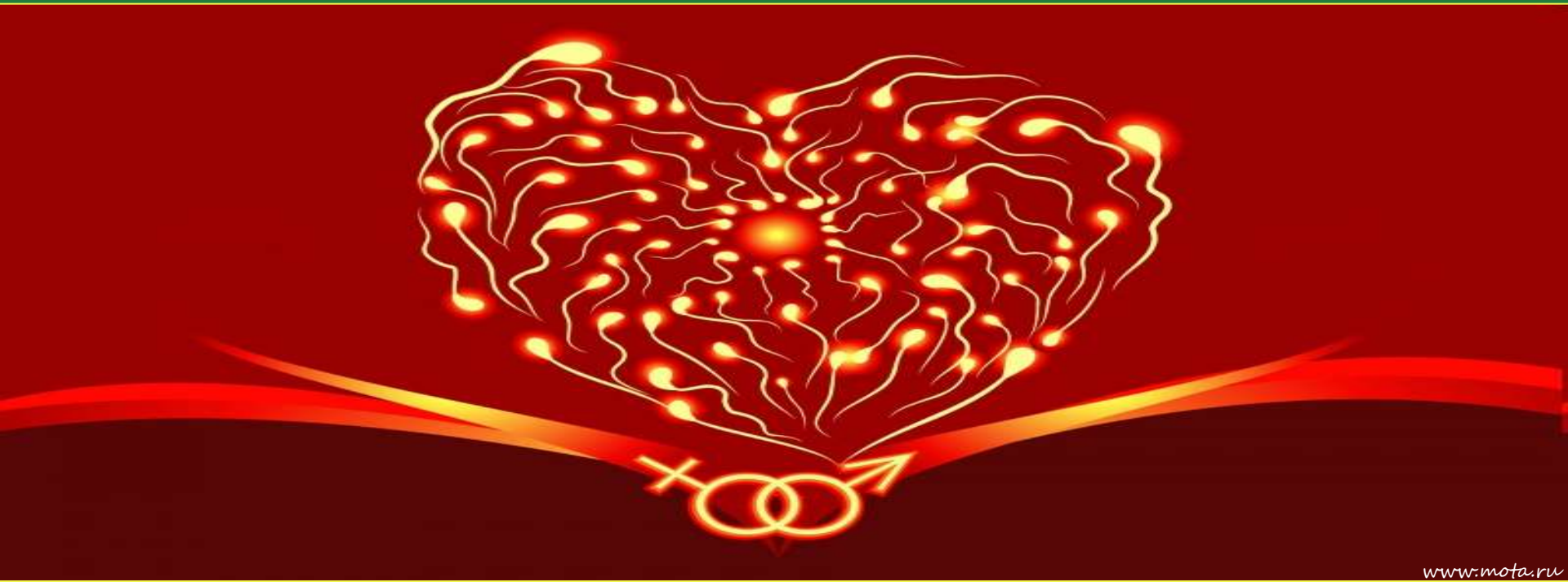
A-F.Holstein et al.,2003http://www.rbej.com/content/1/1/107

Вообщем, сперматогенные клетки делятся, объединяются, дифференцируются, растут, превращаются, индивидуализируются.

Сперматогенез контролируется множеством генов, часть из которых функционирует в сперматогониальном компартменте, другая – во время мейоза, третья группа генов контролирует спермиогенез и никогда не создает генопродукты, необходимые для реакций во время сперматогониальных делений или во время роста сперматоцитов I порядка, их действие дифференцировано.

Сегодня вопрос не в том, какие маркеры свойственны тем или иным типам половых клеток.

А вопрос в том, почему именно так выстраивается сперматогенный процесс в системе, почему сперматогониальные стволовые клетки (ССК), прежде чем превратиться в танцующие сперматозоиды, проходят столь сложный дефиле.



На рубеже 19 и 20 веков двоюродный брат Чарльза Дарвина, основатель биометрики и евгеники *Френсис Гальтон*, пророчествовал: «Для Англии наступят времена, когда для улучшения и воспроизводства расы станет выгоднее покупать лучших людей, чем производить их».

За 60 последних лет среднее число сперматозоидов в эйякулятах здоровых мужчин-европейцев уменьшилось на 40-50%. Сегодня каждый двадцатый мужчина западного мира абсолютно бесплоден.

Работа со сперматогенезом продолжается.

СПАСИБО

THE GREAT SPERM RACE

С.Т.Захидов

torrents.adminko.org