

РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ВЫДЕЛЕНИЯ ПЕРИТУБУЛЯРНЫХ МИОИДНЫХ КЛЕТОК ИЗ СЕМЕННИКОВ КРЫСЫ С ЦЕЛЬЮ ПОЛУЧЕНИЯ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ

Лейберова А.К.^{1,2}, Хрипкова В.В.¹, Храмцова Ю.С.^{1,2}

¹⁾ Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, г. Екатеринбург, Россия

²⁾ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской академии наук (ИИФ УрО РАН), г. Екатеринбург, Россия
E-mail: anna.leyberova@list.ru

DEVELOPMENT OF A TECHNIQUE FOR ISOLATING PERITUBULAR MYOID CELLS FROM THE RAT TESTIS IN ORDER TO OBTAIN A PRIMARY CULTURE

Leiberova A.K.^{1,2}, Khripkova V.V.¹, Khrantsova Y.S.^{1,2}

¹⁾ Ural Federal University, Yekaterinburg, Russia

²⁾ Institute of Immunology and Physiology of the Ural Branch of the Russian Academy of Sciences (IIF UB RAS), Yekaterinburg, Russia

A technique for obtaining a primary cell culture of the peritubular myoid cells has been developed and information has been obtained on the features of its cultivation under specialized conditions to create an experimental model.

Актуальность. На сегодня известно, что перитубулярные миодные клетки (ПМК) кроме обеспечения структурной целостности канальцев семенника и выполнения регуляции движения сперматозоидов, вовлечены и в другие важные процессы, включая паракринную регуляцию сперматогониальных стволовых клеток и влияние на функцию клеток Сертоли и Лейдига. Использование первичных культур клеток семенника в качестве экспериментальной модели может помочь расширить представления о взаимодействии клеток семенного канальца друг с другом. Однако, получение первичных культур, содержащих один тип клеток, связано с рядом сложностей, требующих своего решения.

Цель. Разработать методику выделения ПМК из канальцев семенника для получения первичной культуры.

Материалы и методы. ПМК получали из семенников крыс линии Wistar, возрастом 8 (3 самца) и 3 месяца (4 самца). В стерильных условиях извлекали семенники, их обеззараживали, промывали фосфатным буфером (PBS) в чашке Петри, удаляли капсулу, подвергали разным способам механической и ферментативной дезагрегации. Суспензию фильтровали (сито 100 мкм). Центрифугировали, используя разные режимы. Супернатант сливали, к осадку добавляли питательную среду. Культивировали клетки в культуральном флаконе с обработанной поверхностью. Инкубировали в CO₂ термостате (37 °C и 5%

CO₂). Считали клетки в камере Горяева. Идентифицировали окрашиванием микропрепаратов гематоксилином-эозином и толуидиновым синим, проводили ИГХ-анализ с использованием антител к гладкомышечному актину. Жизнеспособность клеток оценивали МТТ-тестом при каждой генерации с последующим пассажем. Субкультивирование проводилось при формировании монослоя из ПМК. Номера пассажей записывали.

Результаты. При разработке методики выделения ПМК из семенников крысы выделены наиболее успешные манипуляции, приведшие к положительному результату: ферментация: 1 этап – трипсин-ДНКаза (0,25 мг/мл и 1 мкг/мл) 15 минут, 37 °С, 2 этап – коллагеназа-ДНКаза (1 мг/мл и 1 мкг/мл) 15 минут, 37 °С; центрифугирование 5 минут, 400 g; в фильтрации через сито нет необходимости; определен состав питательной среды для культивирования ПМК: RPMI, 10% FBS, 1% антибиотика. Первичную культуру ПМК удалось получить из образцов семенников 3-месячных крыс (культивировать ПМК из семенников 8-месячных крыс не удалось). ПМК самостоятельно адгезировались на 3 сутки. От клеток сперматогенного ряда культура была отмыта к 4 суткам, а получение чистой линии ПМК пришлось на 7 сутки, в тот день когда было выполнено первое пассирование. Субкультура первая насчитывала 2 млн клеток, вторая (11 сутки) – 3,5 млн, третья (18 сутки) – 2,5 млн.

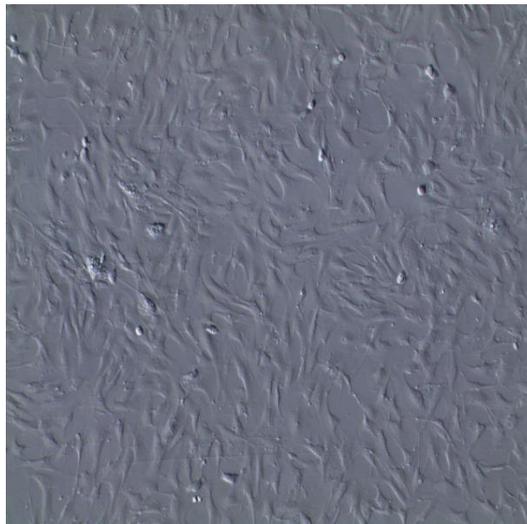


Рис. 1. Первичная культура перитубулярных миодных клеток канальцев семенника крысы, 7 сутки. Увеличение объектива 10X.

Закключение. Разработка методики выделения ПМК из семенников крысы, получения первичной культуры ПМК, ее оценка, повторные отработки методики проводились в течение 10 месяцев. Полученная культура ПМК семенника является первичной нормальной монослойной культурой, переходящей с первым пассажем на 7 сутки в клеточную линию, которую можно использовать в дальнейших исследованиях.