

Клеточное и органотипическое культивирование тканей семенников

UDC 591.463.085.23

A.V. PAKHOMOV*, G.A. BOZHOK, E.I. LEGACH, T.P. BONDARENKO

Cell and Organotypic Culturing of Testicular Tissues

Использование для компенсации андроген-дефицитных состояний трансплантационного материала клеток тестисов, не содержащих высокоиммуногенного герминативного компонента, — одна из альтернатив трансплантации фрагментов тестисов со сперматогенезом [4]. Известно, что одним из способов оценки стероидогенных свойств клеток Лейдига, а также возможным подходом к снижению иммуногенности материала может быть культивирование [3].

Цель работы — исследовать способность ткани и клеток тестисов к стероидогенезу, пролиферации при органотипическом и клеточном культивировании.

Материалы и методы

Объектами исследования были суспензия клеток интерстиция (СКИ) и фрагменты тестисов (ФТ) половозрелых крыс. Суспензию клеток интерстиция тестисов получали после ферментативной обработки ткани и разделения суспензии клеток в ступенчатом градиенте сахарозы определенной плотности по методу [2]. Культивирование СКИ осуществляли в пластиковых чашках Петри диаметром 2,5 см. В чашки Петри с покровными стеклами были внесены $2-2,5 \times 10^6$ интерстициальных клеток. Органотипическое культивирование ФТ проводили по методу [3]. Соотношение между тканью и средой по массе составляло 1:6(7). Клеточное и органотипическое культивирование осуществляли на среде 199 с добавлением 0,1% эмбриональной телячьей сыворотки, антибиотиков (пенициллин — 100 ед/мл и канамицин — 75 мкг/мл) и 20 мМ HEPES (pH 7,2–7,4) при 32–34°C в течение 7 суток. Замену питательной среды проводили на 3-, 5- и 7-е сутки культивирования. Клетки, прикрепленные к покровным стеклам, после фиксации в метаноле окрашивали гематоксилином и эозином и исследовали под световым микроскопом. Содержание тестостерона измеряли в инкубационной среде радиоиммунологическим методом при

Using a transplantation material of testicular cells free of high-immunogenic germinative component to compensate the androgen-deficient state is one of the alternatives of testicular fragment transplantation with spermatogenesis [4]. Culturing is known as a possible way to estimate the steroidogenic properties of Leydig's cells, as well as the approach to reduce the material immunological potency [3].

The research was aimed to investigate the capability of testicular tissue and cells for steroidogenesis, proliferation during organotypic and cell culturing.

Materials and methods

Interstitial cell suspension (ICS) and testicular fragments (TF) of mature rats served the investigation objects. Interstitial cell suspension was procured after treating the tissue with enzymes and dividing cell suspension in a step-like sucrose gradient of the certain density as described in the paper [2]. ICSs were cultured in plastic Petri dishes of 2.5 cm diameter. There were introduced $2-2.5 \times 10^6$ interstitial cells in Petri dishes with cover glasses. FT organotypic culturing was performed by the method, reported in the paper [3]. The ratio between tissue and medium was 1:6 (7) m/m. Cell and organotypic culturing was carried-out using 199 medium supplemented with 0.1% fetal bovine serum, antibiotics (100 units/ml penicillin and 75mg/ml kanamycin) and 20 mM HEPES (pH 7.2–7.4) at 32–34°C for 7 days. Nutrient medium was changed to the 3rd, 5th and 7th culturing days. Cells, attached to cover glasses after fixing in methanol were stained with hematoxylin and eosin, then studied under light microscope. Testosterone content was measured in the incubation medium using radioimmunological method with "RIA ST-testosterone" kits (Byelorussia).

Results and discussion

In this research we obtained the primary culture of testicular interstitial cells of adult rats using the culturing method. When studying testosterone in the incubation

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38
(057) 373-32-92, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkov, Ukraine

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3292, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

помощи наборов «РИА СТ-тестостерон» (Беларусь).

Результаты и обсуждение

В настоящей работе с помощью метода культивирования была получена первичная культура интерстициальных клеток семенников взрослых крыс. При исследовании тестостерона в среде инкубации установлено его значительное содержание на 3-и сутки культивирования (15,35 нмоль/л) и низкое на 7-е (0,3 нмоль/л), что, по-видимому, связано со снижением уровня холестерина в клетках, который является субстратом для синтеза тестостерона.

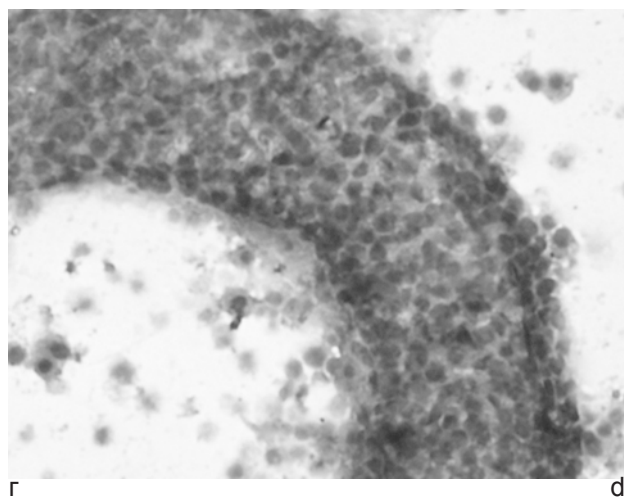
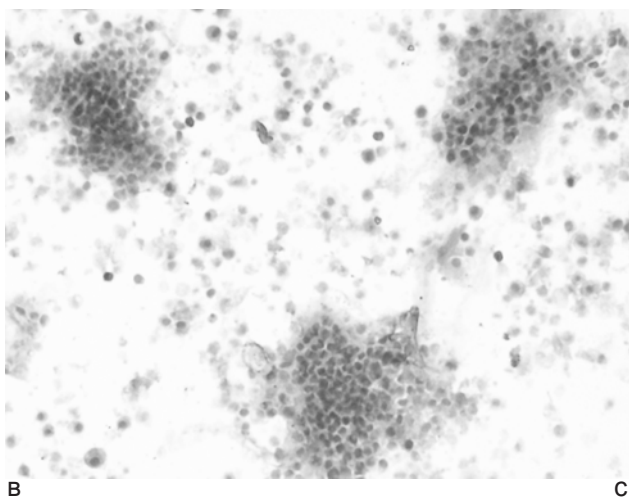
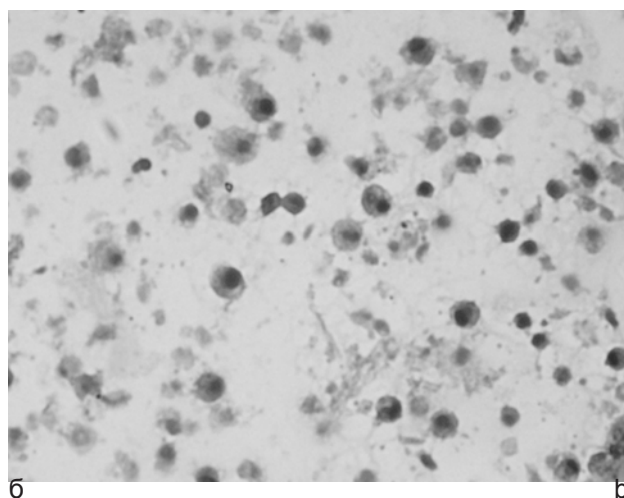
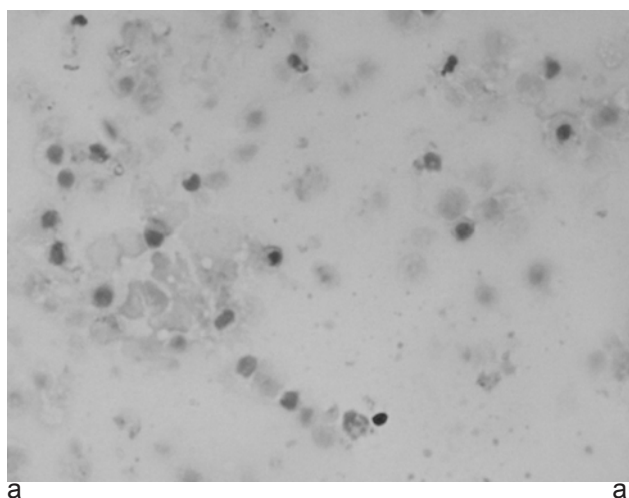
В состав полученной культуры, кроме стероидогенных клеток, входили клетки других типов. Морфологическое исследование фиксированных на покровных стеклах клеток показало в препаратах значительное количество клеток округлой формы, расположенных по одиночке или группами (рисунок, а).

medium, its significant content to the 3rd day of culturing (15.35 nmol/l) and low one to the 7th day (0.3 nmol/l) were established, that was apparently associated to the reduction of cholesterol level in the cells, being the substrate for testosterone synthesis.

In addition to steroidogenic cells the obtained culture comprised the other cell types. Morphological study of cells, fixed on cover glasses demonstrated in preparation a significant number of cells with roundish shape, placed either solery or by groups (Figure, a).

Small cells with a dense nucleus, rounded with insignificant amount of cytoplasm, as well as the large oval cells with granular cytoplasm and some nucleoli were revealed. To the 2nd culturing day an active cell proliferation was observed (Figure a, b) and the cell colonies were formed to the 4th day (Figure, c). Long convoluted cords, consisted of dense packed cells (Figure, d) were formed and cells in mitotic state were determined.

Thus, the data obtained during culturing testify to a significant ICS steroidogenic and proliferative potential,



Культивирование препарата клеток СКИ: на 2-е сутки (а); 3-и сутки (б); 4-е сутки (в); 7-е сутки (г). Окраска гематоксилином и эозином. Ок.10., об. 40.

Culturing of ICS cell preparation to the 2nd day (a); 3rd (b); 4th (c); 7th (d). Staining with hematoxylin and eosin. Oc. 10, lens 40.

Обнаруживаются небольшие клетки с плотным ядром, окруженным незначительным количеством цитоплазмы, а также крупные овальные клетки с зернистой цитоплазмой и несколькими ядрышками. На 2-е сутки культивирования наблюдалась активная пролиферация клеток (рисунок а, б), а на 4-е образовывались колонии клеток (рисунок, в). На 7-е сутки формировались длинные извитые тяжи, состоящие из плотноупакованных клеток (рисунок, г), и определялись клетки в состоянии митоза.

Таким образом, полученные в ходе культивирования данные свидетельствуют о значительном стероидогенном и пролиферативном потенциале СКИ, который может использоваться при трансплантации биологического материала семенников.

Сравнивая результаты культивирования СКИ взрослых крыс с аналогичными исследованиями, проведенными на фрагментах семенников, важно отметить сходную динамику изменения содержания тестостерона в среде. При органотипическом культивировании также характерно некоторое увеличение синтетической активности (23 ± 5 нмоль/мг белка) на 3-и сутки и резкое снижение (10 ± 2 нмоль/мг белка) на 7-е сутки.

Такое падение обусловлено морфологическими особенностями органотипических культур, а именно нарушением трофики исследуемого материала на фоне отсутствия регуляторного влияния [1].

Выводы

Секреторная способность тестикулярной ткани сохраняется в течение 3-х суток органотипического и 5-и суток клеточного культивирования. Значительная пролиферативная способность СКИ делает предпочтительным использование данного биологического материала в качестве источника андрогенов при культивировании и трансплантации.

Литература

1. *Гаврилюк Б.К.* Органотипическое культивирование тканей.– М.: Наука, 1983.– 128 с.
2. *Пахомов А.В., Божок Г.А., Боровой И.А. и др.* Использование флуоресцентной микроскопии для характеристики клеток стероидогенных тканей // Проблемы эндокринной патологии.– 2007.– №4.– С. 78–83.
3. *Потіха О.П.* Морфофункціональна характеристика клітинних та органних культур сім'яників та обґрунтування щодо трансплантації при експериментальному гіпогонадизмі: Дис. ... канд. біол. наук.– Київ, 1993.– 142 с.
4. *Larkin J.H.* Differentiation of first and second-set grafts of embryonic, neonatal and adult testis implanted beneath the kidney capsule of adult rat hosts // Amer. J. Anat. – 1960. – Vol. 106.– P. 73–82.

Поступила 13.05.2008

that may be used under testicular biological material transplantation.

When comparing the results of ICS culturing in adult rats with the same trials, performed in testicular fragments it should be noted a similar dynamics of a change in testosterone content in the medium. Some increase in synthetic activity (23 ± 5 nmol/mg protein) to the 3rd day and a sharp decrease (10 ± 2 nmol/mg protein) to the 7th one are also typical for organotypic culturing.

This fall is stipulated by morphological peculiarities of organotypic cultures, namely disorder in the studied material trophism at the background of no regulatory effect [1].

Conclusions

Secretory ability of testicular tissue is preserved within 3 and 5 days of organotypic and cell culturing, correspondingly. Significant proliferative ability of ICS makes it preferable to use this biological material as androgen source during culturing and transplantation.

References

1. *Gavrilyuk B.K.* Organotypic culturing of tissues: Moscow: Nauka, 1983.– 128 p.
2. *Pakhomov A.V., Bozhok G.A., Borovoj I.A. et al.* Usage of fluorescent microscopy for characteristics of steroid tissue cells// Problemy Endokrinnoy Patologii.– 2007.– N4.– P. 78–83.
3. *Potikha O.P.* Morphofunctional characteristics of testicular cell and organ cultures and transplantation substantiation under experimental hypogonadism: Thesis of candidate of biol. sciences.– Kyiv, 1993.– 142 p.
4. *Larkin J.H.* Differentiation of first and second-set grafts of embryonic, neonatal and adult testis implanted beneath the kidney capsule of adult rat hosts // Amer. J. Anat. – 1960. – Vol. 106.– P. 73–82.

Accepted in 13.05.2008