

Сравнительная характеристика методов выделения клеток сперматогенного эпителия

Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова, А.М. Косырева, М.В. Кондашевская, М.А. Диатроптова, И.С. Цветков, А.А. Степанов, Л.П. Михайлова, К.А. Артемьева

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт морфологии человека», Москва, Россия

Введение. Для изучения биохимических и молекулярно-биологических механизмов процессов сперматогенеза в норме и при его нарушениях необходимо получить изолированные клетки сперматогенного эпителия разных стадий дифференцировки. Клетки сперматогенного эпителия соединены между собой плотными контактами и цитоплазматическими мостиками, разрушение которых позволяет получить суспензию клеток. Для разделения клеток используют ряд методов, включая механический и ферментативные. Состав, концентрация ферментов и время воздействия, применяющиеся разными авторами, широко варьируют. Тем не менее работы по сравнительной оценке эффективности методов выделения клеток сперматогенного эпителия в литературе отсутствуют.

Цель исследования: проведение сравнительного анализа эффективности механического и ферментативных методов выделения клеток сперматогенного эпителия у мышей и определение оптимального способа.

Материалы и методы. В работе использованы самцы половозрелых мышей линии C57BL/6. Клетки выделяли в соответствии с протоколами ферментативных методов по M.L. Meistrich (n=10 – число семенников), Н.Н. Мушкамбарову (n=8) – с использованием ферментов коллагеназы, трипсина, ДНКазы в разных концентрациях, T.G. Pretlow (n=12) – с использованием фермента проназы, Y. Wang (n=8) – с применением фермента гиалуронидазы и механического метода по D. Lam (n=8). Оценивали количество полученных клеток на 1 мг ткани семенника, их жизнеспособность и наличие симпластов (реагрегатов).

Результаты. При использовании разных ферментов, включая проназу, после выделения клеток сперматогенного эпителия и через сутки хранения суспензии клеток в культуральной среде при температуре +4°C получено большое количество клеток сперматогенного эпителия, и их жизнеспособность составила 87–91%. При механическом методе выделения клеток сперматогенного эпителия количество полученных клеток было большим, но наблюдали их низкую жизнеспособность и прогрессирующую гибель в течение суток.

Заключение. По результатам сравнительного анализа оптимальным для выделения клеток сперматогенного эпителия является метод с проназой E. Он позволяет получить достаточное количество жизнеспособных клеток с небольшим числом симпластов.

Ключевые слова: сперматогенный эпителий, сперматоциты, сперматиды, методы выделения

Для корреспонденции: Елена Алексеевна Пономаренко. E-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

Для цитирования: Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова, А.М. Косырева, М.В. Кондашевская, М.А. Диатроптова, И.С. Цветков, А.А. Степанов, Л.П. Михайлова, К.А. Артемьева. Сравнительная характеристика методов выделения клеток сперматогенного эпителия. Клини. эксп. морфология. 2019;8(3):55-63. DOI: 10.31088/СЕМ2019.8.3.55-63

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Статья поступила 26.06.2019. Получена после рецензирования 20.08.2019. Принята в печать 18.09.2019.

Comparative characteristics of spermatogenic cells isolation methods

E.A. Ponomarenko, O.V. Makarova, A.M. Kosyeva, M.V. Kondashevskaya, M.A. Diatroptova, I.S. Tsvetkov, A.A. Stepanov, L.P. Mikhailova, K.A. Artem'eva

Research Institute of Human Morphology, Moscow, Russia

Introduction. To study the biochemical and molecular-biological mechanisms of spermatogenesis in the normal condition and after its violations, it is necessary to obtain isolated spermatogenic cells of different stages of differentiation. Spermatogenic cells are interconnected by tight contacts and cytoplasmic bridges, the destruction of which allows to obtain a suspension of cells. A number of methods are used to separate cells, including

mechanic and enzymatic ones. The composition, concentration of enzymes, and exposure times used by various authors vary widely. However, there are no works about a comparative assessment of the effectiveness of methods for isolated spermatogenic cells in the literature. The aim is conduction of a comparative analysis of the effectiveness of mechanic and enzymatic methods of spermatogenic cells isolation in mice and determine the optimal method.

Materials and methods. We used male adult C57Bl/6 mice. Cells were isolated in accordance with the protocols of enzymatic methods: according to M.L. Meistrich (the number of testes is 10 (n=10), N.N. Mushkambarov (n=8) – with using collagenase, trypsin, DNase in different concentrations, T.G. Pretlow (n=12) – with using pronase, Y.Wang (n=8) – with using the enzyme hyaluronidase; and the mechanic method according to D.Lam (n=8). The number of cells obtained per 1 mg of testis tissue, their viability and the presence of symplasts (reaggregates) were evaluated.

Results. A large number of spermatogenic cells were obtained and their viability was 87–91% by using various enzymes after isolation of spermatogenic cells, including pronase, and following 24 hours of storage of cell suspension in a culture medium at 4°C. Using of the mechanic isolation method, the number of obtained epithelial cells was big, but their viability was low and progressive death were observed during the day.

Conclusion. According to the results of the comparative analysis, the optimal method for isolation of spermatogenic cells is the enzymatic method with pronase E. It allows to get a high quantity of viable cells with a small number of symplasts.

Key words: seminiferous epithelium, spermatocytes, spermatids, isolation methods

Corresponding author: Elena A. Ponomarenko. E-mail: ponomarenkoea75@mail.ru

For citation: E.A. Ponomarenko, O.V. Makarova, A.M. Kosyreva, M.V. Kondashevskaya, M.A. Diatroptova, I.S. Tsvetkov, A.A. Stepanov, L.P. Mikhailova, K.A. Artem'eva. Comparative characteristics of spermatogenic cells isolation techniques. Clin. exp. morphology. 2019;8(3):55-63. (In Russ.). DOI: 10.31088/CEM2019.8.3.55-63

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 26.06.2019. **Received in revised forms** 20.08.2019. **Accepted** 18.09.2019.

Введение

Клетки сперматогенного эпителия разных стадий дифференцировки имеют характерные цитологические признаки. Они отличаются по диаметру, площади поперечного сечения, плотности, что позволяет проводить их выделение [1]. Получение клеток сперматогенного эпителия разных стадий дифференцировки необходимо для изучения биохимических и молекулярно-биологических механизмов процессов сперматогенеза в норме и при его нарушениях [1–3]. Клетки сперматогенного эпителия разделяют путем центрифугирования в градиенте плотности фикола, перкола, ренографина, глицерина, в STU-PUT системе при 1g (седиментация под действием гравитации) и с помощью сортера клеток [2–5].

Важным подготовительным этапом к разделению клеток является их выделение из семенников. Клетки сперматогенного эпителия дифференцируются в составе клонов, где они связаны между собой и с клетками Сертоли с помощью цитоплазматических мостиков. Между клетками сперматогенного эпителия также наблюдают плотные контакты, щелевые и десмосомные межклеточные соединения [6, 7]. Вследствие указанных особенностей строения сперматогенного эпителия выделение клеток из семенников имеет ряд трудностей. Так, при получении суспензии клеток не только нарушаются межклеточные соединения, но и происходит повреждение клеток со снижением их жизнеспособности. Нарушение цитоплазматических мостиков может приводить к последующему слиянию (реагрегации) клеток в суспензии с образованием симпластов, кото-

рые осаждаются быстрее и препятствуют эффективному разделению клеток [1]. Все эти проблемы привели к появлению разных методов выделения клеток сперматогенного эпителия, включая механический и ферментативные. Состав, концентрация ферментов и время воздействия, использующиеся разными авторами, варьируют [1, 2, 4–6, 8–10].

Тем не менее сравнительный анализ методов выделения клеток сперматогенного эпителия, предложенных разными авторами, включая механическое [3] и ферментативные [4, 6, 8, 9], не проводили.

Цель работы – проведение сравнительного анализа эффективности механического и ферментативных методов выделения клеток сперматогенного эпителия у мышей и определение оптимального способа.

Материалы и методы

При исследовании использовали самцов мышей линии C57BL/6 массой тела 24–28 граммов (питомник «Столбовая» НЦБМТ ФМБА России). В работе с экспериментальными животными руководствовались приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в других научных целях (Страсбург, 18 марта 1986 года). Животных выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации под эфирным наркозом. Проводили забор семенников для дальнейшего выделения клеток сперматогенного эпителия.

Для получения суспензии клеток сперматогенеза нами были выбраны метод механического разделения

клеток по D. Lam [3] (количество семенников в группе: $n=8$) и методы ферментативной обработки: с применением ферментов коллагеназы, трипсина, ДНКазы по M.L. Meistrich [4] ($n=10$), по Н.Н. Мушкамбарову с соавт. [6] ($n=8$), гиалуронидазы по Y. Wang [9] ($n=8$), проназы E по T.G. Pretlow [8] ($n=12$).

Сравнительную оценку методов выделения клеток осуществляли в соответствии с рекомендациями Н.Н. Мушкамбаров (1982) и M.L. Meistrich (1977) по количеству клеток, полученных из 1 мг ткани семенника мыши, жизнеспособности клеток и выраженности агрегации [6, 11].

Механическое выделение клеток

Выделение клеток из семенников проводили по D. Lam и Р.Я. Фрешни [3, 12]. Семенные каналцы рассекали на фрагменты 3–5 мм и последовательно пропускали их через клеточное сито с диаметром пор 100 мкм, а затем 70 мкм. Клетки хранили в культуральной среде DMEM с 25 mM HEPES и 4,5 г/л глюкозы («Панэко», Россия) с 10% FCS (Fetal Calf Serum, PAA laboratories GmbH, Австрия) в течение суток при температуре $+4^{\circ}\text{C}$.

Ферментативное выделение клеток

Метод M.L. Meistrich [4] заключался в рассечении каналцев семенников на фрагменты около 0,2 мм. С учетом того, что это трудоемкий процесс, мы модифицировали методику M.L. Meistrich [4] и сделали ее более щадящей. Семенники освобождали от белочной оболочки, затем одним блоком семенные каналцы переносили в раствор коллагеназы IV типа (Worthington Biochemical Corporation, США) – 0,16 мг/мл, в течение 20 минут инкубировали при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе. Далее каналцы переносили в DPBS (раствор Дюльбекко) и ресуспендировали. После трехкратного отмывания в DPBS фрагменты семенных каналцев осаждали в течение 2 минут. Надосадек удаляли, проводили дополнительное рассечение тканевых фрагментов и добавляли 5 мл предварительно подогретого до 37°C 0,25% трипсина («Панэко», Россия) и 40 мкг/мл ДНКазы (AppliChem, Германия), инкубировали в CO_2 -инкубаторе 8 минут. Суспензию клеток и остатки семенных каналцев пропускали через клеточное сито (диаметр пор 100 мкм) и добавляли 10 мл DPBS с 0,1% глюкозой и 5 mM DNA (2-naphthol-6,8-disulfonic acid, dipotassium salt, TCI, Япония)). По данным M.L. Meistrich [11], при использовании DNA жизнеспособность клеток повышалась на 35%, и в итоге она составила 98%. Тем не менее после применения DNA автор отмечал разрушение акросом, потерю цитоплазмы, жгутиков и мембран в продолговатых сперматидях. Полученную суспензию клеток мы центрифугировали при 320 g в течение 10 минут. Супернатант удаляли и к осадку добавляли среду DMEM с 25 mM HEPES и 4,5 г/л глюкозы («Панэко», Россия) с 10% FCS (PAA laboratories GmbH, Австрия), клетки ресуспен-

дировали и хранили при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение суток.

При выделении клеток семенников по Y. Wang [9] нами были изменены состав ферментов и их концентрация. На первом этапе выделения использовалась коллагеназа IV типа (Worthington Biochemical Corporation, США) в концентрации 0,16 мг/мл, а на втором – 1 mM раствор EDTA для связывания ионов кальция и гиалуронидаза (Sigma, США) – 0,02 мг/мл – для разрушения межклеточных соединений.

Метод выделения по Н.Н. Мушкамбарову [6], применяемый нами, не отличался от авторского. Были использованы растворы ферментов: 0,16 мг/мл коллагеназа типа IV (Worthington Biochemical Corporation, США), (20 минут, 33°C), 2,5 мг/мл трипсин («Панэко», Россия) и 0,002 мг/мл ДНКазы (AppliChem, Германия) (8 минут, 33°C).

При ферментативном выделении клеток сперматогенного эпителия по T.G. Pretlow [8] вместо трипсина использовали фермент проназу E. Выполняли забор семенников, помещали их в культуральную среду 199 («Панэко», Россия) при температуре $+4^{\circ}\text{C}$. Делали небольшой надрез белочной оболочки семенника и извлекали извитые семенные каналцы одним блоком.

Семенные каналцы помещали в раствор DMEM с 25 mM HEPES и 4,5 г/л глюкозы («Панэко», Россия), 0,16 мг/мл коллагеназы типа IV (Worthington Biochemical Corporation, США), 5% фетальной сыворотки – FCS (PAA laboratories GmbH, Австрия) и инкубировали 20 минут при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ в CO_2 -инкубаторе. Раствор коллагеназы позволяет разобщить каналцы и удалить интерстициальные клетки [13]. После инкубации с раствором коллагеназы семенные каналцы единым блоком переносили в раствор DPBS, без Ca^{2+} , Mg^{2+} («Панэко», Россия), 0,5% FCS и бережно пипетировали, используя наконечник с широким просветом. После оседания семенных каналцев супернатант, содержащий интерстициальные клетки и клетки каналцев, удаляли. Процедуру повторяли 2–3 раза.

Затем семенные каналцы переносили в инкубационную среду следующего состава: DMEM с 25 mM HEPES, 4,5 г/л глюкозы («Панэко», Россия), 0,05% проназы E (Sigma, США,), 20 мкг ДНКазы (AppliChem, Германия). Семенные каналцы инкубировали в течение 10 минут при температуре $+37^{\circ}\text{C}$, затем осторожно пипетировали.

Следует отметить, что проназа E активируется в присутствии ионов магния и кальция (DMEM содержит ионы магния) и инактивируется хелатными соединениями (EDTA) или при отмывании клеток растворами, не содержащими Ca^{2+} , Mg^{2+} (DPBS).

Суспензию клеток и остатки семенных каналцев пропускали через клеточное сито с диаметром пор 100 мкм с помощью поршня шприца с резиновым покрытием. Суспензию клеток переносили в пробирку и добавляли 10 мл DPBS с 0,1% глюкозы, 5 mM DNA (2-naphthol-6,8-disulfonic acid, dipotassium salt,

ТС1, Япония), 0,5% FCS. Центрифугировали при 320 g 10 минут при 4°C. Клетки помещали в среду DMEM с 25 mM HEPES и 4,5 г/л глюкозы с 10% FCS, 20 мкг/мл гентамицина и 2 mM глутамина («Панэко», Россия).

После выделения клеток сперматогенного эпителия и через сутки после хранения суспензии определяли абсолютное количество половых клеток на 1 мг ткани семенника, их жизнеспособность и выраженность реагрегации.

Оценку жизнеспособности выделенных половых клеток проводили по методу Шрека [14]. К 200 мкл трипанового синего (0,1% раствор на дистиллированной воде) («Биохиммак», Россия) и 200 мкл эозина (0,1% раствор на 2xPBS) («Биохиммак», Россия) добавляли суспензию клеток в объеме 100 мкл. При выделении клеток сперматогенного эпителия по T.G. Pretlow [8] оценку жизнеспособности проводили не только по методу Шрека, но и с использованием эозина и пропидий йодида.

Оценку жизнеспособности клеток с помощью только эозина выполняли по методике, предложенной в руководстве ВОЗ [15]. Готовили 0,5% раствор эозина на 0,9% растворе NaCl. Затем на предметное стекло нанесли 5 мкл суспензии клеток семенника мыши и 5 мкл раствора эозина, каплю покрывали покровным стеклом 20×22 мм и считали окрашенные (погибшие) клетки под фазово-контрастным микроскопом в расчете на 200 клеток.

Жизнеспособность клеток также определяли при окраске пропидий йодидом с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Раствор пропидия йодида (Propidium iodide, Sigma, США) готовили из расчета 0,1 мг/мл раствора (0,3 M NaCl, 0,03M цитрат натрия, pH 7,0). К 1 мл клеточной суспензии в PBS добавляли 20 мкл раствора пропидия йодида и инкубировали 30 минут при температуре +37°C [16]. Долю жизнеспособных клеток определяли с помощью проточного цитофлуориметра (Beckman Coulter, Inc. Fullerton, CA, США).

В суспензии клеток, выделенных из семенника мыши, под микроскопом (×400) оценивали наличие симпластов и их размер.

Важной характеристикой метода выделения клеток из семенников является наличие клеток сперматогенного эпителия всех стадий дифференцировки. В связи с этим в мазках проводили дифференцированный подсчет клеток сперматогенного эпителия, выделенных из семенника. Мазок высушивали и фиксировали в жидкости Шабадша, проводили ШИК-реакцию и окрашивали гематоксилином («Биохиммак», Россия) [17]. Затем проводили докрасивание цитоплазмы эозином в течение 1–2 секунд.

Статистический анализ проводили при помощи программы Statistical10 (StatSoft, США). Непрерывные количественные данные описывали медианой и квартилями (Q25% и Q75%). Дисперсионный анализ про-

водили критерием Краскела–Уоллиса. При наличии статистической разницы применяли попарное сравнение групп методом Манна–Уитни. При множественном сравнении групп использовали поправку Бонферрони. Нулевая гипотеза отвергалась при ошибке первого рода менее 5% с учетом эффекта множественного сравнения. Статистические различия зависимых выборок – жизнеспособность клеток сперматогенного эпителия после выделения и через сутки – оценивали критерием Вилкоксона.

Результаты исследования

При сравнительном анализе методов выделения клеток из семенников получены статистически значимые различия по количеству клеток на 1 мг ткани семенника. Сравнение методов выделения позволило выявить, что при механическом методе наблюдается максимальное количество клеток на 1 мг семенника мыши $4,3(3,6; 4,5) \times 10^5$ по сравнению с методами M.L. Meistrich ($p=0,0002$), Y. Wang ($p=0,006$), Н.Н. Мушкамбарова ($p=0,001$) и T.G. Pretlow ($p=0,000009$) (табл. 1). Ферментативные методы по Y. Wang с гиалуронидазой и по Н.Н. Мушкамбарову с низкой концентрацией коллагеназы и трипсином дают сопоставимое число клеток ($p=0,3$), так же, как и ферментативные методы по M.L. Meistrich и по T.G. Pretlow (с проназой E) ($p=0,5$). Метод Y. Wang дает большее число клеток по сравнению с методами M.L. Meistrich ($p=0,0003$) и T.G. Pretlow ($p=0,0003$). Так же, как и метод Н.Н. Мушкамбарова дает большее число клеток по сравнению с методами M.L. Meistrich ($p=0,009$) и T.G. Pretlow (с проназой) ($p=0,002$).

Количество полученных жизнеспособных клеток (в процентах) статистически значимо различалось между группами. Наименьший процент жизнеспособных клеток получен при механическом выделении клеток по сравнению с ферментативным методом по M.L. Meistrich ($p=0,0002$), выделением клеток по Н.Н. Мушкамбарову ($p=0,0007$) и при использовании фермента проназы E ($p=0,00009$). Показатели жизнеспособности клеток сперматогенного эпителия при механическом выделении сопоставимы с таковыми при использовании метода Y. Wang (с гиалуронидазой) ($p=0,13$). При выделении клеток ферментативными методами по M.L. Meistrich, по Н.Н. Мушкамбарову и по T.G. Pretlow (с проназой E) показатели содержания жизнеспособных клеток в сравниваемых группах статистически значимо не различались ($p=0,3$). Таким образом, несмотря на высокий выход клеток, при механическом способе выделения жизнеспособность была выше при применении всех ферментативных методов, кроме метода с использованием гиалуронидазы.

Большое количество работ по выделению клеток, а затем их разделению в градиенте плотности предполагает проведение двух этапов: первый этап – выделение клеток (1-е сутки), второй этап – разделение в STU-PUT системе (2-е сутки), поэтому была проведена оценка

Таблица 1 / Table 1

Сравнительный анализ методов выделения клеток семенника мыши по показателям абсолютного числа клеток и их жизнеспособности сразу и через сутки после выделения Me (Q25%; Q75%)
Comparative analysis of methods for isolating mouse spermatogenic cells by the absolute number of cells and their viability immediately and one day after the isolation Me (Q25%; Q75%)

Показатели	Методы					p*
	механический [3] (n=8)	ферментативный				
		1. по M.L. Meistrich [4] (n=10)	2. по Y. Wang [9] (n=8)	3. по Н.Н. Мушкамбарову [6] (n=8)	4. по T.G. Pretlow [8] (n=12)	
Количество клеток на 1 мг семенника $\times 10^5$	4,3 (3,6;4,5)	1,2 (0,9;1,8)	2,6 (2,2;3,1)	2,5 (1,6;2,8)	1,3 (0,8;1,4)	0,0001
Жизнеспособность после выделения, метод Шрека	57 (50;64)	91 (87;94)	64 (58;71)	87 (82;92)	91 (88;94)	0,0001
Жизнеспособность через сутки после выделения, метод Шрека	42 (36;48)	69 (53;78)	51(45;53)	73 (69;85)	80 (75;87)	–

p* – тест Краскела–Уоллиса. Сравнительный анализ между группами проводили только при получении суспензии клеток по показателям количества клеток на 1 мг семенника мыши и их жизнеспособности после выделения

p* – Kruskal–Wallis test. A comparative analysis between the groups was carried out only after obtaining a suspension of cells in terms of the cell number per 1 mg of mouse testis and their viability after isolation

их жизнеспособности через сутки после выделения. Показано, что при механическом способе медиана их жизнеспособности снижалась с 57% до 42% ($p=0,037$), что свидетельствует о прогрессирующей гибели клеток в течение суток.

При ферментативных методах выделения клеток в течение суток также наблюдалась их гибель. Так, при выделении клеток по M.L. Meistrich медиана их жизнеспособности снижалась с 91 до 69% ($p=0,005$). Схожую динамику уменьшения количества жизнеспособных клеток через сутки наблюдали при использовании протоколов по Н.Н. Мушкамбарову – с 87 до 73% ($p=0,01$) и по Y. Wang (с гиалуронидазой) – с 64 до 51% ($p=0,005$).

При использовании протокола по T.G. Pretlow (с проназой E) жизнеспособность клеток сперматогенного эпителия сохранялась на высоком уровне и составила 80% через сутки после выделения ($p=0,006$).

Важным показателем качества выделенных из семенника клеток является их способность образовывать реакрегагаты – симпласты. Из всех методов наименьшее количество симпластов через сутки наблюдали при использовании фермента проназы E.

Для оценки жизнеспособности клеток, полученных при всех методах выделения, использовали способ Шрека. Поскольку существуют и другие методы

оценки жизнеспособности, мы провели сравнительный анализ результатов на примере оптимального протокола T.G. Pretlow (табл. 2).

При сравнении результатов всех трех использованных методов оценки жизнеспособности клеток сперматогенного эпителия статистически значимые различия показателей не выявлены ($p=0,12$), в то время как через сутки при использовании оценки жизнеспособности клеток с пропидием йодидом показатель был достоверно выше в сравнении с методами Шрека ($p=0,006$) и эозином ($p=0,006$) (табл. 2). Сравнение двух методов оценки жизнеспособности клеток только с эозином и по методу Шрека различия не выявило ($p=0,5$). Возможно, выявленные различия связаны с тем, что окраска эозином является цитоплазматической, трипановый синий/эозин – ядерной и цитоплазматической, а пропидием йодидом – только ядерной. Очевидно, нарушение плазматической мембраны клеток предшествует повреждению ядерной [18].

При оценке качественного состава полученной суспензии клеток сперматогенного эпителия (табл. 3) морфологию клеток определяли по признакам, описанным нами ранее [19]. При использовании метода выделения клеток с проназой E в мазках отсутствовали клетки на стадиях I и II мейотического деления, что может быть связано с небольшой продолжительностью этого пе-

Таблица 2 / Table 2

Различные методы определения показателей жизнеспособности клеток семенника мыши при выделении клеток сперматогенеза с использованием фермента проназы E (n=12), Me (Q25%; Q75%)
 Different methods for determining the viability of mouse spermatogenic cells using pronase E (n=12), Me (Q25%; Q75%)

Сроки	Метод оценки жизнеспособности			p*
	метод Шрека (трипановый синий/эозин)	метод с пропидий йодидом	метод с эозином	
Жизнеспособность сразу после выделения клеток (%)	89 (88;94)	93 (90;94)	90 (88;93)	0,12
Жизнеспособность через сутки после выделения клеток (%)	80 (75;87)	89 (86;91)	84 (81;86)	0,005

p* – тест Краскела–Уоллиса

p* – Kruskal–Wallis test

Таблица 3 / Table 3

Состав суспензии клеток (%), полученной при их выделении с ферментом проназа E
 (через сутки после выделения), n=10

The composition of the cell suspension (%) obtained by isolation with pronase E enzyme (one day after isolation), n=10

Тип клеток: сперматогонии	Me Q25%;Q75%	Деление: профаза I мейоза	Me Q25%;Q75%	Спермиогенез, сперматиды:	Me Q25%;Q75%
Тип A0	11,5 (5;16)	Прелептотена	8 (5;16)	Стадия I	14 (13;22)
Тип A1	7,5 (5;11)	Лептотена ранняя	3 (0;3)	Стадия II	14 (12;20)
Тип A2	3 (0;12)	Лептотена поздняя	51 (46;62)	Стадия III	10 (6;20)
Тип A3	8 (3;14)	Зиготена	21 (16;35)	Стадия IV	11 (6;22)
Тип A4	18,5 (11;23)	Пахитена	115 (106;130)	Стадия V	29,5 (19;32)
Тип Пр.	13 (7;17)	Диплотена	12,5 (8;20)	Стадия VI	31,5 (19;44)
Тип B	21,5 (13;29)	Диакинез	6,5 (3;7)	Стадия VII	37 (30;42)
		Метафаза I мейоза	0	Стадия VIII	61,5 (36;72)
		Анафаза I мейоза	0	Стадия IX	32,5 (22;41)
		Телофаза I мейоза	15,5 (7;20)	Стадия X	45,5 (39;49)
		Метафаза II мейоза	0	Стадия XI	66,5 (57;91)
Клетки Сертоли	20,5(7;32)	Анафаза II мейоза	0	Стадия XII	252 (187;266)
Клетки Лейдига	3(0;10)	Телофаза II мейоза	0	(этапы 12–16)	

риода и тем, что клетки в процессе деления наиболее подвержены разрушению ферментами.

Обсуждение

При использовании методов выделения клеток сперматогенеза, предложенных в работах M.L. Meistrich [4], Н.Н. Мушкамбарова с соавт. [6], Y.Wang с гиалуронидазой [9], T.G. Pretlow с ферментом проназа E [8] и D. Lam [3] при механическом разделении клеток, нами был проведен сравнительный анализ количественных показателей клеток сперматогенного эпителия на 1 мг семенника после выделения, а также их жизнеспособности сразу и через сутки после выделения.

Механический метод, предложенный D. Lam (1970), позволяет получить довольно высокий выход клеток.

Жизнеспособность их в полученной суспензии составляла около 57% и снижалась до 42% в течение суток. Необходимо отметить: неудовлетворительные результаты при механическом выделении клеток семенников отмечали и другие исследователи, что инициировало разработку ферментативных методов выделения [1, 4, 8, 13].

Ферментативный метод включает обработку коллагеназой IV типа, затем трипсином и ДНКазой. Теоретическое и практическое обоснование двухэтапного ферментативного выделения клеток исследователи связывают с тем, что при «мягкой» обработке коллагеназой удастся удалить интерстициальные клетки, затем под действием трипсина и ДНКазы разрушить непосредственно семенные каналы и выделить клетки

сперматогенного эпителия [13]. Большинство авторов – A.R. Bellve [1], T. Vuchou [10], J.M. Bryant [5], T. Garcia [13] – предлагают использовать коллагеназу IV типа в концентрации 1 мг/мл. Следует отметить, что при применении нами данной концентрации коллагеназы было сложно контролировать время обработки. Так, воздействие более 1 минуты вызывало полное разрушение семенных канальцев, частичное разрушение клеток и образование их массивных агрегатов, возможно, связанное с выходом ДНК из поврежденных клеток [1]. Недостаточная временная экспозиция с ферментом коллагеназой приводит к тому, что семенные канальцы не фрагментируются на отдельные участки. Последующее промывание DPBS останавливает разрушающее воздействие коллагеназы на семенные канальцы, но дальнейшее применение трипсина было неэффективным: удавалось экстрагировать только часть клеток канальцев за более продолжительный отрезок времени. В связи с этим оптимальным оказалось применение на первом этапе коллагеназы IV типа в низкой концентрации 0,16 мг/мл, как предложено Н.Н. Мушкамбаровым [6]. Результаты, полученные нами при использовании методов выделения клеток сперматогенного эпителия по Н.Н. Мушкамбарову [6] и M.L. Meistrich [11], оказались сопоставимыми. Отличие метода M.L. Meistrich [11] от метода выделения половых клеток по Н.Н. Мушкамбарову [6] состояло в измельчении канальцев и применении DNA(2-naphthol-6,8-disulfonic acid, dipotassium salt). При выделении клеток сперматогенного эпителия по Н.Н. Мушкамбарову [6] применяли только ферменты. Оба метода позволяют получить достаточное количество клеток с высокой жизнеспособностью. Следует отметить, что в суспензии клеток определяли большое количество симпластов. Это является препятствием для разделения клеток в градиенте плотности, поэтому был рассмотрен метод по Y. Wang (с гиалуронидазой) [9]. По этому методу среда для выделения клеток содержала высокую концентрацию коллагеназы 0,625 мг/мл на первом этапе обработки и ряд ферментов: трипсин, коллагеназу, гиалуронидазу, ДНКазу на втором. Учитывая предыдущий опыт применения коллагеназы, концентрацию фермента мы не увеличивали, оставив 0,16 мг/мл. Для разрушения плотных контактов и других межклеточных соединений сперматогенного эпителия канальцев на втором этапе использовали только EDTA и гиалуронидазу. При сравнительном анализе выделения клеток по методу Y. Wang (с гиалуронидазой) и других методов были выявлены низкая жизнеспособность полученных клеток и в течение суток ее прогрессирующее снижение. Эти результаты сопоставимы с данными, полученными при механическом способе выделения клеток. В связи с тем, что образовывались симпласты, был применен метод с использованием фермента проназы E в концентрации 0,05%, рекомендованной для выделения клеток из других тканей. По результатам сравнительного анализа при использовании этого метода количество

клеток в суспензии сохраняется в течение суток, и их жизнеспособность остается на высоком уровне (при выделении – 86–99%, через сутки – 74–92%). Симпласты клеток были единичными. Таким образом, метод выделения суспензии клеток сперматогенного эпителия T.G. Pretlow (с проназой E) является оптимальным.

Заключение

Протоколы ферментативного выделения половых клеток семенных канальцев многочисленны, но они не стандартизованы, и жизнеспособность полученных клеток сперматогенного эпителия в суспензии различается. Сравнительный анализ методов, приведенных в литературе, и предложенные нами изменения некоторых их этапов позволили разработать оптимальную схему получения большого количества жизнеспособных клеток из семенника мыши, основанную на использовании ферментов, включая проназу E.

Вклад авторов

Концепция и дизайн исследования – Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова.

Сбор и обработка материала – Е.А. Пономаренко, А.М. Косырева, М.В. Кондашевская, М.А. Диатроптова, И.С. Цветков, А.А. Степанов, К.А. Артемьева.

Статистическая обработка данных – Е.А. Пономаренко.

Написание текста – Е.А. Пономаренко, О.В. Макарова, М.А. Диатроптова.

Редактирование – О.В. Макарова, А.М. Косырева, Л.П. Михайлова.

Author contributions

Conceived the study and designed the experiment – Е.А. Ponomarenko, O.V. Makarova.

Collected and processed the data – Е.А. Ponomarenko, A.M. Kosyрева, M.V. Kondashevskaya, M.A. Diatroptova, I.S. Tsvetkov, A.A. Stepanov, K.A. Artem'eva.

Statistical analysis – Е.А. Ponomarenko.

Wrote the paper – Е.А. Ponomarenko, O.V. Makarova, M.A. Diatroptova.

Edited the manuscript – O.V. Makarova, A.M. Kosyрева, I.S. Tsvetkov, L.P. Mikhailova.

Литература/References

1. Bellve AR. Purification, culture, and fractionation of spermatogenic cells. In: Wassarman P.M., DePamphilis M.L., editors. *Guida to techniques in mouse development. Methods Enzymol*, volum 225. New York: Academic Press; 1993. P. 84–113.
2. Глазков М.В. Фракционирование сперматогонических клеток крысы в нелинейном градиенте фиколла. *Онтогенез*. 1980;11(5):555–8.
Glazkov MV. Fractionation of the rat spermatogonial cells in the non-linear ficoll gradient. *Ontogenesis*. 1980;11(5):555–8. (In Russ.).
3. Lam DM, Furrer R, Bruce WR. The separation, physical characterization, and differentiation kinetics of spermatogonial cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 1970;65(1):192–9.

4. *Meistrich ML*. Separation of mouse spermatogenic cells by velocity sedimentation. *J. Cell Physiol.* 1972;80(2):299–312.
5. *Bryant JM, Meyer-Ficca ML, Dang VM et al.* Separation of spermatogenic cell types using STA-PUT velocity sedimentation. *J. Vis. Exp.* 2013;80: <http://www.jove.com/video/50648>.
6. *Мушкambarов Н.Н., Волкова Н.П., Николаев А.Я.* Стабильность и жизнеспособность сперматогенных клеток после их выделения и фракционирования. *Цитология.* 1982;24(6): 719–23.
Mushkambarov NN, Volkova NP, Nikolaev AY. Stability and viability of mouse spermatogenic cells after their isolation and separation. *Cytology.* 1982;24(6):719–23 (In Russ.)
7. *Бурнашева С.А., Габаева Н.С., Данилова Л.В., Князева Е.Ф., Костомарова А.А., Райцина С.С.* Современные проблемы сперматогенеза. Москва: Наука, 1982.
Burnasheva SA, Gabaeva NS, Danilova LV, Knyazeva EF, Kostomarov AA, Raitsina SS. Actual problems of spermatogenesis. Moscow: Nauka, 1982. (In Russ.)
8. *Pretlow TG, Scalise MM, Weir EE.* Separation of hamster testicular cells in successive stages of differentiation by velocity sedimentation in an isokinetic gradient of Ficoll in tissue culture medium. *Am. J. Pathol.* 1974;74(1):83–94.
9. *Wang Y, Culty M.* Preparation of enriched mouse syncytia-free pachytene spermatocyte cell suspensions. In: Chan WY, Blomberg LA, editors. *Germline Development. Methods Mol. Biol.*, volum 825. New York: Humana Press; 2012. P. 67–74.
10. *Buchou T, Tan M, Barral S et al.* Purification and analysis of male germ cells from adult mouse testis. In: Krämer OH, editor. *HDAC/HAT Function Assessment and Inhibitor Development. Methods Mol. Biol.*, volum 1510. New York: Humana Press; 2017. P. 159–168.
11. *Meistrich ML.* Separation of spermatogenic cells and nuclei from rodent testes. In: Prescott DM (ed). *Methods Cell Biol.*, volum XV. New York: Academic Press; 1977. P. 15–54.
12. *Фреини Р.Я.* Культура животных клеток: Практическое руководство. Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2010.
Freshney RJ. Culture of animal cells. A manual of basic technique. Moscow: BINOM. Laboratory of knowledge, 2010. (In Russ.)
13. *Garcia T, Hofmann MC.* Isolation of undifferentiated and early differentiating type A spermatogonia from Pou5f1-GFP reporter mice. In: Chan WY, Blomberg LA (eds). *Germline Development. Methods Mol. Biol.*, volum 825. New York: Humana Press; 2012. P. 31–44.
14. *Schrek R.* A method for counting the viable cells in normal and in malignant cell suspensions. *Ann. J. Cancer.* 1936;28:389–92.
15. Курило Л.Ф. (ред.) Руководство ВОЗ по исследованию и обработке эякулята человека. Москва: Капитал принт, 2012.
Kurilo LF. (ed.) WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Moscow: Capital print, 2012. (In Russ.)
16. Propidium Iodide Nucleic Acid Stain [editorial], <http://www.thermofisher.com>. 2006.
17. *Пономаренко Е.А., Кузикянц С.А., Мхитаров В.А.* Модифицированный метод окраски акросом сперматид у мышей. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2017;2:72–5.
Ponomarenko EA, Kuzikyants SA, Mkhitarov VA. Modified acrosome staining for murine spermatids. *Clin. Exp. Morphology.* 2017;2:72–5 (In Russ.)
18. *Плосконос М.В.* Применение эозина и йодистого пропидия для оценки жизнеспособности сперматозоидов человека. *Клиническая и лабораторная диагностика.* 2014;11:22–5.
Ploskonos MV. The application of eosin and propidium iodide in evolution of vitality of human spermatozoa. *Russian clinical laboratory diagnostics.* 2014;11:22–5. (In Russ.)
19. *Пономаренко Е.А., Мхитаров В.А., Кузикянц С.А., Золотова Н.А., Хочанский Д.Н., Цветков И.С. и др.* Цитологическая характеристика клеток сперматогенного эпителия у мышей C57BL/6. *Клиническая и экспериментальная морфология.* 2018;3:42–51.
Ponomarenko EA, Mkhitarov VA, Kuzikyants SA, Zolotova NA, Khochansky DN, Tsvetkov IS et al. Cytological characteristic of spermatogenic epithelium cells in C57BL/6 mice. *Clin. Exp. Morphology.* 2018;3:42–51 (In Russ.)

Информация об авторах

Елена Алексеевна Пономаренко – кандидат медицинских наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Ольга Васильевна Макарова – доктор медицинских наук, заведующая лабораторией иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Анна Михайловна Косырева – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Марина Владиславовна Кондашевская – доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Марина Анатольевна Диатроптова – младший научный сотрудник, центральная патологоанатомическая лаборатория НИИ морфологии человека.

Иван Сергеевич Цветков – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Александр Алексеевич Степанов – научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Лилия Петровна Михайлова – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммуноморфологии воспаления НИИ морфологии человека.

Ксения Александровна Артемьева – кандидат медицинских наук, научный сотрудник лаборатории патологии репродукции НИИ морфологии человека.

Author information

Elena A. Ponomarenko – Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-9672-7145>.

Olga V. Makarova – Dr. Sci. (Med.), Head of the Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology
[/https://orcid.org/0000-0001-8581-107X](https://orcid.org/0000-0001-8581-107X).

Anna M. Kosyreva – Dr. Sci.(Biol), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-6182-1799>.

Marina V. Kondashevskaya – Dr. Sci.(Biol), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-1302-8446>.

Marina A. Diatropova – Junior Researcher, Central Pathology Laboratory, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-0858-8369>.

Ivan S. Tsvetkov – Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0003-0946-1105>.

Alexander A. Stepanov – Researcher, Laboratory of Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-5036-1387>.

Lilia P. Mikhailova – Dr. Sci. (Med.), Leading Researcher, Laboratory of Immunomorphology of Inflammation, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-0479-8684>.

Ksenia A. Artem'eva – Cand. Sci. (Med.), Researcher, Laboratory for Pathology of Reproduction, Research Institute of Human Morphology.
<https://orcid.org/0000-0002-1014-752X>.