

2. Давыдов О. Н., Пьянов В. М., Никитенко А. Г. и др. Профилактика паразитарных болезней рыб // Ветеринария.— 1984.— С. 45—46.
3. Ведемейер Г. А., Мейер Ф. П., Смит Л. Стресс и болезни рыб.— М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1981.— 128 с.
4. Иванова Н. Т. Атлас клеток крови рыб.— М.: Легк. и пищ. пром-сть, 1982.— 184 с.
5. Иванова Н. С. Влияние некоторых химиопрепаратов на рыб // Экспресс-информация. Рыбное хоз-во: Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов.— М., 1987.— Вып. 4.— С. 13—15.
6. Козлов Л. В., Вавилова П. М., Голосова Т. В. Микрометод определения факторов комплемента // Иммунология.— 1985.— № 3.— С. 66—68.
7. Литвиненко В. В., Осадчая Е. Ф. Разработка эритроцитарного диагностикума и реакции непрямої гемагглютинации (РНГА) для определения уровня накопления антител в сыворотке крови кролика и рыб к рабдовирусу карпа // Экспресс-информация. Рыбное хоз-во: Рыбохозяйственное использование внутренних водоемов.— М.: ЦНИИТЭИРХ, 1986.— Вып. 5.— С. 1—5.
8. Микс Э. Реакция образования спонтанных розеток // Иммунологические методы.— М.: Мир, 1979.— С. 501—508.
9. Озерецковская Н. Н. Система «хозяин — паразит» и химиотерапия // Тр. Всесоюз. о-ва гельминтологов.— 1986.— № 36.— С. 203—211.
10. Рудиков Н. И. Вирусы и вирусные болезни рыб // Итоги науки и техники. ВИНТИ. Ихтиология.— 1985.— 1.— С. 6—92.
11. Сборник правил, инструкций и наставлений по борьбе с болезнями рыб.— Рыбное: Изд-во М-ва рыб. х-ва, 1972.— 213 с.
12. Смирнова О. В., Кузьмина Т. А. Определение бактерицидной активности сыворотки крови методом фотонейфелометрии // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.— 1966.— № 4.— С. 8—11.
13. Obradović J. Djelovanje metilenskog medrila i kloramfenikola na parazita *Ichthyophthirius multifiliis* kod somovskog mlada (*Silurus glanis* L.) do mjesec dana strazosti // Vet. Arh.— 1983.— 53.— N 1.— P. 17—22.
14. Prost M., Studnicka M., Niezgoda J. O toksycznosci sieleni malachitowej i bliekitu metylenowego // Gospodarka Rybna, 1975.— N 6.— P. 9.
15. Svobodova Z. Vliv metylenove modri podavane v krmivu na zdravotni stav karpu faina // Zivočisna Vyroba, 1983.— 28, N 11.— P. 851—858.

Ин-т зоологии им. И. И. Шмальгаузена
АН УССР, Киев

Материал поступил в редакцию 12.07.88

УДК 611.453.018.1:612.453]—084

Н. Д. Тронько, В. М. Пущкарев, Т. И. Богданова,
Ю. Ю. Саутин, А. С. Микоша

Получение и фракционирование в градиенте перколлы клеток коры надпочечников морских свинок и характеристика их функционального состояния

Суспензии изолированных клеток являются ценной экспериментальной моделью для изучения быстрых биохимических процессов, в частности, связанных с проведением и трансформацией внешних регуляторных сигналов. Первоначально разделение клеток коры надпочечников проводили с использованием трипсина [13, 16]. В дальнейшем широкое распространение получила коллагеназа, меньше повреждающая клетки [9, 10]. В последние 10 лет предприняты попытки разделить и очистить клетки, соответствующие разным зонам коры надпочечников [8, 10, 11, 17]. Однако при критическом анализе результатов этих работ возникает ряд вопросов. Характеризуя состав неочищенных клеточных суспензий коры надпочечников, авторы практически никогда не указывают, содержались ли в суспензиях помимо адренокортикоцитов иные клетки, в частности клетки крови. Основопологающим критерием определения зональной принадлежности клеток служит, по мнению Nyatt и соавт. [10, 11], главным образом число липидных капель. Далеко не всегда характеризуется ультраструктура клеток, влияние условий выделения на их выход. В связи с этим, с нашей точки зрения, возможность разделения клеток коры надпочечников по их принадлежности к разным зонам коры требует уточнения.

Цель настоящей работы — получение суспензии клеток коры надпочечников морской свинки с максимальным выходом, очистка и фракционирование адренокортикоцитов в градиенте плотности перколла, определение состава, характеристика ультраструктуры и некоторых биохимических параметров клеток по фракциям.

Методика

Исследования проведены на ткани надпочечников самцов морских свинок массой 250—300 г. При диспергировании клеток использовали коллагеназу фирмы «Fluka» (удельная активность 270 МЕД/мг), бычий сывороточный альбумин (БСА) фирмы «Seriva», НЕРЕС — «Calbiochem», среду Игла и солевой раствор Хэнкса отечественного производства.

Для характеристики клеточных суспензий применяли тест с трипановым синим и паноптическое окрашивание по Май — Грюнвальд — Романовскому после осаждения клеток из небольшой аликвоты на предметное стекло с помощью стандартных центрифуги¹. При электронно-микроскопическом исследовании клетки фиксировали глутаральдегидом и четырехокисью осмия, дегидратировали в этаноле и заключали в эпон-812. После ультрамикротомии и окрашивания в уранилацетате и цитрате свинца препараты просматривали в электронном микроскопе JEM 100 С.

Для определения плотности растворов перколла в градиенте использовали рекомендуемый фирмой-изготовителем («Pharmacia») рефрактометрический подход. Предварительно были проверены коэффициенты светопреломления стандартных растворов перколла, приготовленных на солевой смеси Хэнкса. Зависимость светопреломления от концентрации перколла в диапазоне 5—80 % практически имеет линейный характер, что позволяет использовать рефрактометрию для оценки плотности фракций градиента.

При изучении биосинтеза белка и альдостерона клетки ($10-900 \cdot 10^3$) суспендировали в фосфатном буферном растворе Krebs — Рингера, содержащем 140 ммоль/л Na^+ , 1 ммоль/л K^+ , 2 ммоль/л Ca^{2+} и $[^3\text{H}]$ -лейцин (до 0,1 МБк/мл). Пробы, объемом 1 мл, инкубировали на водяной бане при легком встряхивании в течение 20 мин при температуре 37 °С, затем быстро охлаждали, клетки разрушали замораживанием — оттаиванием и осаждали белки 5 %-ной трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Осадок через 30 мин (2 °С) переносили на фильтры GF/C, промывали последовательно 5 %-ной ТХУ и этанолом, высушивали и просчитывали в стандартном толуольном сцинтилляторе в счетчике Mark III.

Содержание альдостерона в пробах, после их инкубации в течение 20 мин при температуре 37 °С, определяли с помощью радиоиммунологических наборов фирмы «Sorin Biomedica» (Италия). Для характеристики связывания адренокортикотропного гормона (АКТГ) клетками использовали ^{125}I -АКТГ, йодированный с хлорамином Т [7]. Нативность ^{125}I -АКТГ проверяли по его способности связываться с микросомами коры надпочечников, а удельную радиоактивность определяли методом самозамещения [18]. Инкубационную среду для определения связывания готовили на основе среды Игла с 5 мг/мл БСА и 10 ммоль/л НЕРЕС. В нее вносили 10^5-10^6 клеток и около 30 нг ^{125}I -АКТГ, радиоактивность которого — 10^5 имп/мин. Конечный объем пробы — 250 мкл. Инкубацию проводили при комнатной температуре в течение 60 мин. Связывание останавливали помещением пробирок в ледяную баню и разбавлением холодной средой Игла в 5 раз. Клетки осаждали центрифугированием (800 g, 30 мин, 4 °С). В осадке просчитывали радиоактивность на γ -счетчике Gammacord II (фирма «Miles»), определяя относительное количество (%) связанного клетками АКТГ, меченого ^{125}I . Параметры связывания АКТГ (константу ассоциации — K_a и максимальное связывание — B_{max}) определяли графически и с помощью программы для калькулятора «Электроника МК-61» [3].

Результаты и их обсуждение

Получение диспергированных клеток. Диспергирование клеток даже при использовании коллагеназы приводит к определенному их повреждению. Мы исследовали возможность сокращения времени ферментатив-

¹ Выражаем признательность кандидату медицинских наук М. А. Грузову за помощь в проведении и обсуждении этого анализа.

ной обработки ткани и влияние результатов такого изменения условий диспергирования на целостность клеток. Ткань коры надпочечников, очищенную и тщательно измельченную на холоду, промывали средой Игла. Диспергирование ткани осуществляли двумя способами.

Первый способ. Измельченную ткань инкубировали в нитроцеллюлозных пробирках в среде Игла, добавляя 0,5 % БСА; 0,5 мг/мл коллагеназы, 10 ммоль/л HEPES, в течение 60 мин на водяной бане при температуре 37 °C и перемешивании. Объем среды составлял 2 мл из расчета на ткань 3—5 животных. Чтобы ускорить разрушение конгломератов, содержащее пробирок многократно набирали в пластиковую пипетку с оплавленными краями. Эту процедуру проделывали 3—5 раз за время инкубации. Полученную суспензию фильтровали через плотную нейлоновую марлю, клетки осаждали центрифугированием (600 g, 10 мин) и промывали средой Игла.

Второй способ. Измельченную ткань коры надпочечников инкубировали в среде Игла с указанными добавками, но при наличии только 0,25 мг/мл коллагеназы в течение 40 мин, после чего, пользуясь пластиковой пипеткой, проводили дезагрегацию. Инкубат фильтровали через нейлоновую марлю, из фильтрата осаждали клетки и переводили их в среду Игла. Остаток ткани, удержанный фильтром, инкубировали в свежей порции среды с коллагеназой в течение 20 мин, после чего вновь проводили дезагрегацию, фильтрацию и осаждение клеток. Для полного диспергирования ткани эту процедуру осуществляли трижды. Все полученные клетки объединяли, осаждали центрифугированием и суспендировали в 0,5—1,0 мл среды Игла.

Выход жизнеспособных клеток ткани коры надпочечников в значительной мере зависит от методики обработки ткани коллагеназой и ее механического дезагрегирования. Результаты окрашивания клеток по Май — Грюнвальд — Романовскому свидетельствуют о наличии в суспензии значительной примеси эритроцитов. При использовании первого способа диспергирования число эритроцитов особенно велико и может в несколько раз превышать число ядерных клеток, большая часть которых представлена адренокортикоцитами. При использовании второго способа число ядерных клеток в суспензии удается повысить примерно до 50 %. Видимо, длительная обработка коллагеназой, а также механические воздействия при дезагрегации ткани повреждают прежде всего секреторные клетки. Уменьшение этих воздействий при использовании второго, четырехэтапного, способа повышает выход адренокортикоцитов. В среднем из ткани коры надпочечников одного животного удается получить $4—5 \cdot 10^6$ клеток. Жизнеспособность клеток, определяемая с помощью трипанового синего, в обоих случаях была выше 95 %. Клетки сохраняют ее такой же в течение многих часов (как минимум 20—24 ч), если в среду добавить 0,5 % БСА либо 10 % телячьей эмбриональной сыворотки, а также 100 мкг/мл пеницилина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10 мкг/мл гентамицина.

Поскольку для изучения регуляции синтеза гормонов желательнее иметь гомогенную суспензию адренокортикоцитов, следующим этапом нашей работы было изучение возможности фракционирования исходной суспензии в градиенте плотности перколла.

Разделение клеток в градиенте плотности перколла. В исследованиях группы Taft в основном использовали метод очистки адренокортикоцитов в самоформирующемся градиенте плотности перколла. 30 %-ный раствор перколла центрифугируют в угловом роторе при $20—100 \cdot 10^3$ g в течение 20—30 мин. На образовавшийся сигмовидный градиент наносят образцы и центрифугируют в течение 20—30 мин при 800 g. Использование сигмовидного градиента с протяженным плато посредине центрифужной пробирки весьма ограничивает возможности оценки плавучей плотности клеток и их разделение, поэтому мы применили линейные градиенты.

Линейный градиент перколла в диапазоне 5—80 % (объем 10 мл) формировали, используя устройство, описанное Мак-Конки [2], в течение

ние не менее 30 мин. Исходные растворы перколла готовили на солевой смеси Хэнкса в соответствии с методическими указаниями фирмы «Pharmacia». После приготовления градиент отстаивали в течение 20 мин, и на него наносили слой клеточной суспензии объемом около 5 % объема градиента перколла. Центрифугирование проводили в бакет-роторе центрифуги Т-23 (ГДР) в течение 5 мин при 100 g, и затем — 35—40 мин при 600 g без охлаждения. Содержимое пробирок разделяли на фракции по 250 мкл, используя специальное устройство [4], измеряли плотность в каждой 3—6-й фракции и подсчитывали в камере Горяева число клеток в каждой фракции. Клетки отмывали от перколла центрифугированием при 800 g и суспендировали в свежей среде. Тест с трипановым синим показывает, что фракционирование в перколле не влияет на жизнеспособность клеток.

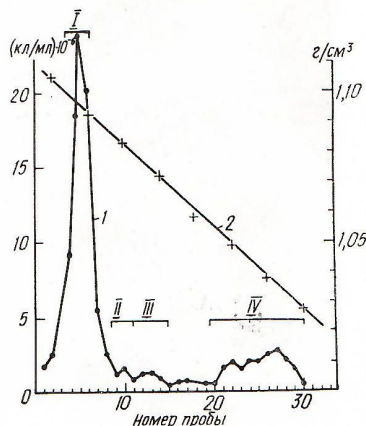


Рис. 1. Распределение диспергированных клеток коры надпочечников в фракциях (I—IV) градиента плотности перколла:
1 — концентрация клеток, 2 — плотность перколла.

Образующийся линейный градиент перколла имеет практически идеальную форму (рис. 1). Выбранные в качестве исходных 5 %- и 80 %-ные растворы перколла дают возможность получить градиент в пределах плотности 1,01—1,12 г/см³. В таком градиенте распределяются все типы клеток, выделенные в результате диспергирования ткани коры надпочечников морских свинок. В соответствии с их плавучей плотностью клетки разделяются на четыре основные фракции: I — клетки плотностью 1,09—1,1, II — клетки плотностью 1,08, III — клетки плотностью 1,07, IV — клетки плотностью 1,03—1,05 г/см³. Последняя фракция является наиболее гетерогенной. Клетки из каждой зоны градиента объединяли, отмывали от перколла и изучали их морфологические характеристики, способность синтезировать белок, альдостерон и связывать АКТГ.

Морфологический анализ фракционированных клеток. Морфологическое исследование полученных фракций показало, что I включает только эритроциты (рис. 2, а), II и III — эритроциты и лейкоциты (рис. 2, б). В III фракции определяется небольшое количество разрушенных или деструктивно измененных адренокортикоцитов (рис. 2, в). В IV фракции, напротив, доминируют адренокортикальные клетки и лишь изредка встречаются единичные эритроциты, лейкоциты и видоизмененные эндотелиоциты (рис. 2, г). Форма адренокортикоцитов, как правило, округлая с ровной поверхностью или с немногочисленными инвагинациями плазмалеммы (рис. 3, а, б). Ядра клеток с высоким содержанием гетерохроматина, характеризуются извилистой поверхностью. В цитоплазме дифференцируются гетерогенные по размеру, форме и осmioфильности матрикса митохондрии с пластинчатыми кристами, хорошо развитая незернистая эндоплазматическая сеть, рибосомы и полисомы. В отдельных клетках выявляются также немногочисленные каналы зернистой эндоплазматической сети, диктиосомы комплекса Гольджи (см. рис. 3, б) и гранулоподобные структуры, в которых, возможно, сосредоточены кортикостероидные гормоны [1, 14]. Число липидных капель, содержащих эфиры холестерина, существенно варьирует (рис. 3, 4, а). Следует подчеркнуть, что в некоторых клетках отчетливо выражена гипертрофия незернистой эндоплазматической сети, комплекса Гольджи, митохондрий, просветлен цитоплазматический матрикс (рис. 3, б, 4, б). Таким образом, диспергированные клетки ткани коры над-

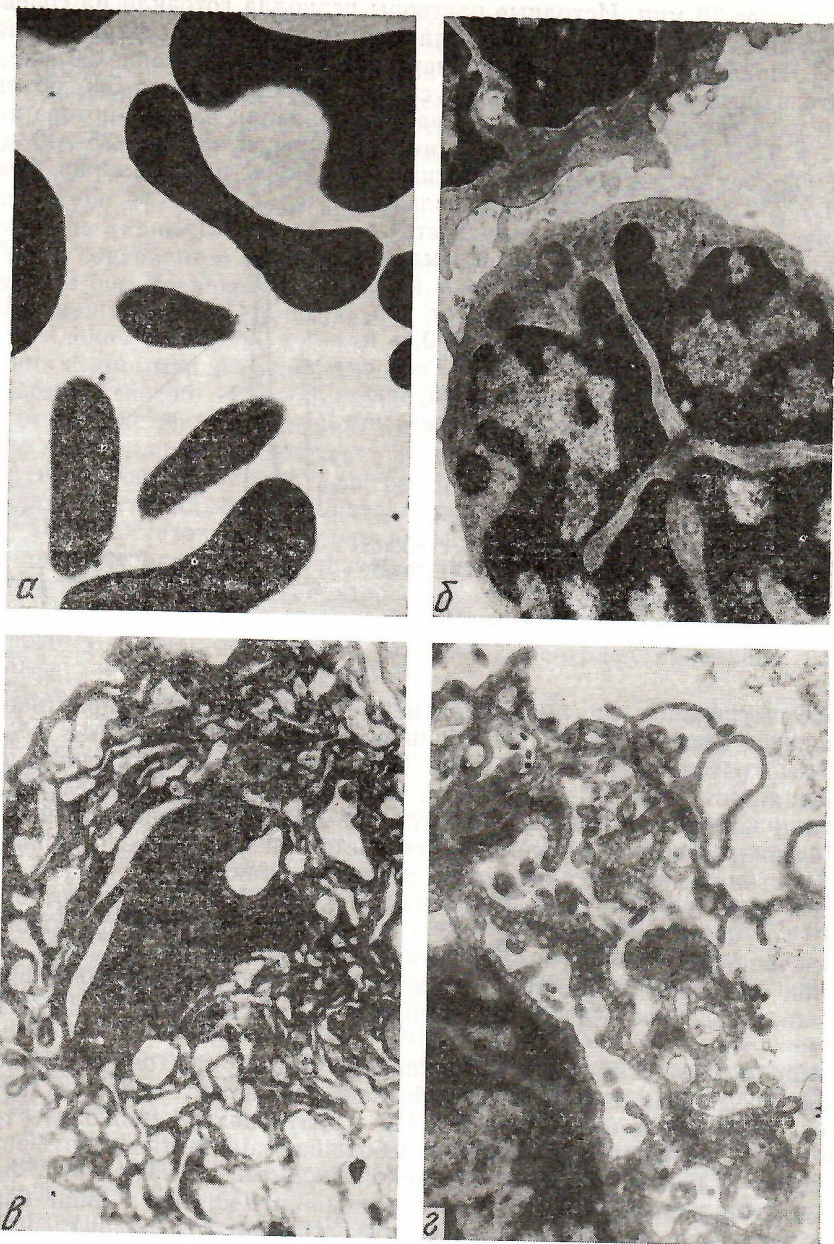


Рис. 2. Различные гистологические компоненты коры надпочечников морских свинок после фракционирования в градиенте перколлы:
а — I фракция (эритроциты), $\times 8500$; *б* — II фракция (лейкоциты), $\times 18\ 000$; *в* — III фракция (разрушенный адренокортикоцит), $\times 12\ 500$; *г* — IV фракция (преформированный эндотелиоцит), $\times 14\ 500$.

почечников имеют, по ультрамикроскопическим характеристикам, различную функциональную активность, что проявляется в состоянии основных стероидсинтезирующих органелл: митохондрий, эндоплазматической сети, комплекса Гольджи. Вместе с тем дифференцировать описанные клетки в плане принадлежности к определенной зоне не представляется возможным, поскольку нет четких ультраструктурных критериев зональной гистологической архитектоники. В нативной ткани коры надпочечников таковыми являются: форма и размеры эпителиальных клеток, их взаиморасположение в ткани, характеристика митохондрий и их крист, число липидных капель, строение эндоплазматической сети и соотношение ее зернистого и незернистого компонентов.

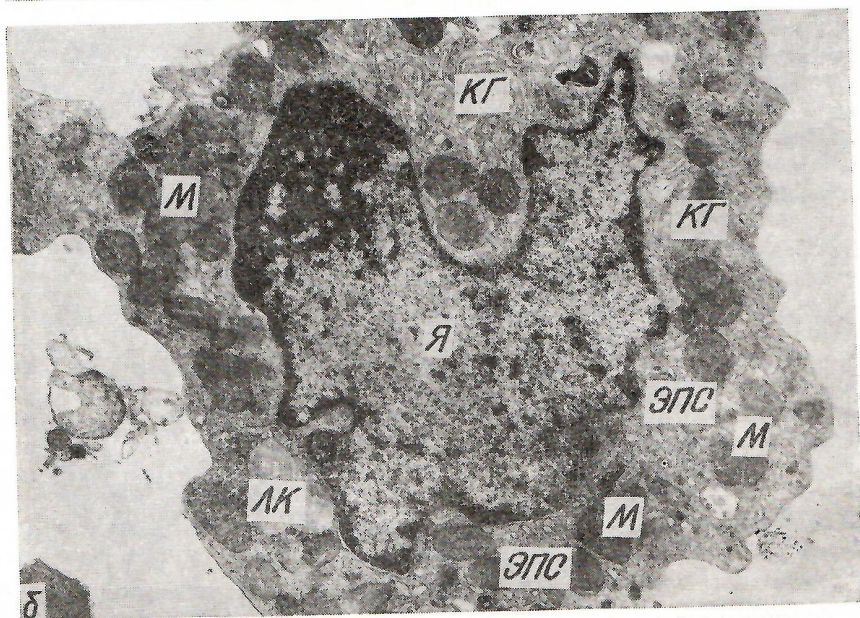
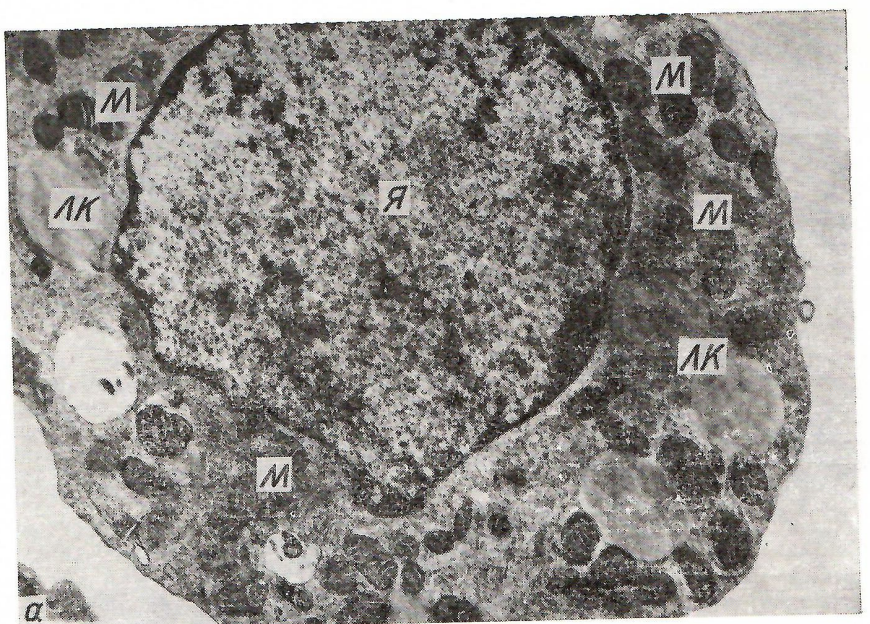


Рис. 3. Аденокортикоцит IV фракции:

а — клетка округлой формы с ровной поверхностью, ядро с незначительными инвагинациями нуклеолеммы, митохондрии с осmioфильным матриксом и пластинчатыми кристами (Я — ядро, М — митохондрии, ЛК — липидные капли), $\times 12\,000$; б — клетка и ядро с глубокими инвагинациями плазмалеммы и нуклеолеммы. В цитоплазме хорошо выражены зернистая эндоплазматическая сеть, комплекс Гольджи (КГ — комплекс Гольджи, ЭПС — зернистая эндоплазматическая сеть, остальные обозначения те же, что на рис., а), $\times 12\,000$.

У морских свинок, по данным литературы [12, 14, 15] и результатам наших наблюдений, клетки наружной (клубочковой) зоны характеризуются скудным содержанием липидных капель, более разнообразной формой митохондрий, имеющих тубулярные и пластинчатые кристы, значительным содержанием элементов зернистой эндоплазматической сети, рибосом и полисом. Внутренние зоны (пучковая и сетчатая) представлены чрезвычайно сходными по структуре клетками, отличающимися лишь формой и в некоторых случаях содержанием липидов в цитоплазме. Как правило, липидные капли более многочисленны в пучковой

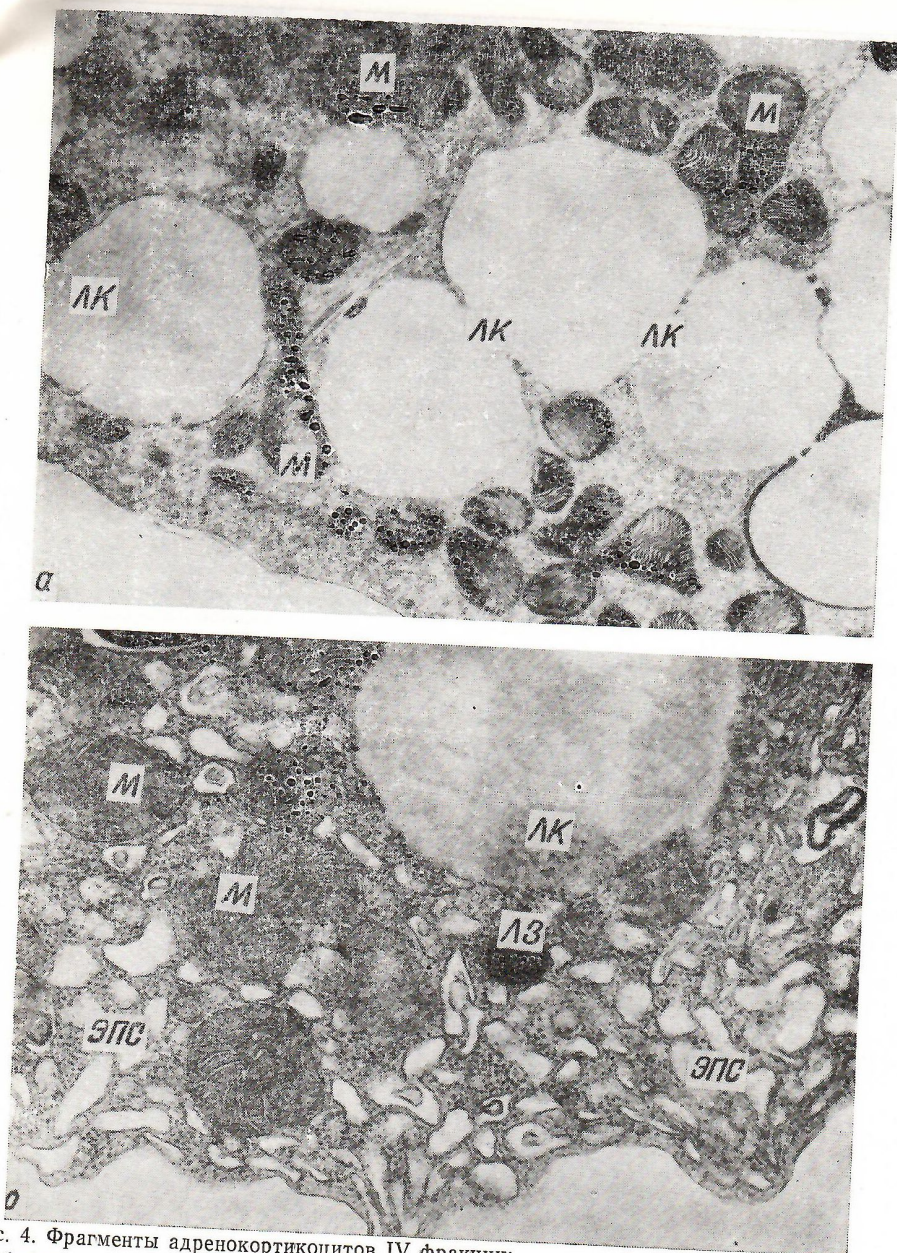


Рис. 4. Фрагменты аденокортикоцитов IV фракции:
 а — большое количество липидных капель в цитоплазме, высокая осмиофильность матрикса митохондрий, преформирование их крист. Обозначения те же, что на рис. 3. $\times 14\,500$; б — расширение канальцев эндоплазматической сети, снижение осмиофильности матрикса митохондрий. Обозначения те же, что на рис. 3. $\times 20\,000$.

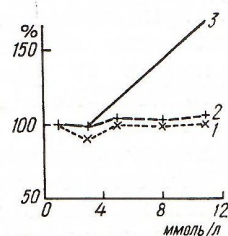
зоне. Важно подчеркнуть, что для этого вида млекопитающих не характерен такой важный признак зональной принадлежности, как различная структура митохондриальных крист: во внутренних зонах митохондрии содержат пластинчатые кристы, мало отличающиеся от турбулярных наружной зоны.

Диспергирование и последующее фракционирование аденокортикоцитов нивелируют различия формы клеток и устраняют весьма зыбкие отличия тубулярных и пластинчатых крист митохондрий. В связи с этим гетерогенность клеток по содержанию липидных капель, отражающему вероятнее всего интенсивность стероидогенеза, или, как отмечают некоторые авторы [10, 11], по полиморфизму митохондрий, с

нашей точки зрения, не является аргументом для причисления наблюдаемых клеток к той или иной зоне. Возможно, что *in vitro* клетки ткани коры надпочечников вообще утрачивают признаки зональной принадлежности, что мы уже наблюдали при исследовании органных культур надпочечников новорожденных поросят [6]. Возможно также, что адренокортикоциты вне организма теряют способность к выработке некоторых кортикостероидов и при этом нарушается регуляция стероидогенеза, что отражается на структурных характеристиках клеток. Поэтому мы исследовали сохранность стероидогенной функции выделенных клеток и механизмов ее реализации.

Рис. 5. Зависимость скорости биосинтеза белка в диспергированных клетках от концентрации ионов калия в инкубационной среде:

1 — клетки I фракции, 2 — III, 3 — IV. Включение аминокислотной метки в белки выражено в процентах по отношению к включению, наблюдаемому при концентрации K^+ 1 ммоль/л.



Определение биосинтеза альдостерона, регуляторного влияния K^+ и связывания кортикотропина диспергированными клетками. Обнаружено, что наибольшее количество гормона (1200—1300 пг/10⁵ клеток) находится в инкубатах IV фракции. Незначительное количество альдостерона обнаруживается также в I и III фракциях. По-видимому, наличие небольшого количества альдостерона в других фракциях объясняется примесями клеток ткани коры надпочечников в этих фракциях, а также сорбцией альдостерона клетками, составляющими основу фракций.

Ранее мы установили, что при повышении в инкубационной среде концентрации K^+ до уровня, стимулирующего биосинтез альдостерона, активируется биосинтез белка, причем характер кривой зависимости скорости трансляции от концентрации K^+ в среде практически совпадает с кривой зависимости биосинтеза альдостерона. Высказано предположение, что биосинтез белка — необходимый промежуточный этап в регуляции стероидогенеза ионами калия [5]. Оказалось, что только клетки IV фракции реагируют изменением скорости синтеза белка в ответ на повышение концентрации K^+ в инкубационной среде (рис. 5). В клетках остальных фракций белковый синтез оставался практически постоянным при всех исследуемых концентрациях K^+ . Очевидно, в составе IV фракции находятся клетки, происходящие из клубочковой зоны коры и сохраняющие чувствительность к регуляторным воздействиям.

Важной биохимической характеристикой адренокортикоцитов является их способность связывать АКТГ. Клетки IV фракции (адренокортикоциты) связывают в среднем 1,6—1,8 % внесенного в среду ¹²⁵I-АКТГ, что вполне сопоставимо со способностью к связыванию АКТГ микросомами клеток ткани коры надпочечников, не подвергавшейся действию коллагеназы. При анализе параметров связывания по методу Скэтчарда K_a для микросом составляет $1,8 \cdot 10^8$ л/моль, для клеток — $1,3 \cdot 10^8$ л/моль, а V_{max} — $0,7 \cdot 10^{-9}$ и $2 \cdot 10^{-9}$ моль/л соответственно. Сходство параметров связывания АКТГ микросомами и изолированными клетками свидетельствует о том, что при диспергировании ткани коллагеназой и выделении клеток нативность мембранных рецепторов АКТГ не нарушается.

Обращает на себя внимание тот факт, что клетки фракций I—III также весьма интенсивно связывают ¹²⁵I-АКТГ, причем во фракциях II, III в некоторых случаях это связывание даже примерно на 30 % выше, чем во фракции IV. Эритроциты, выделенные из периферической крови, в аналогичной системе связывали в несколько десятков раз меньше ¹²⁵I-АКТГ, чем адренокортикоциты, очищенные в градиенте перколлы, а также эритроциты и лейкоциты, содержащиеся во фракциях II и III. Это наблюдение наводит на мысль, что при выделении клеток фрагмен-

ты мембран разрушающихся адренокортикоцитов, содержащие рецепторы АКТГ, адсорбируются поверхностью эритроцитов и лейкоцитов фракций I—III. Предположение о возможности миграции рецепторов с секреторных на кровяные клетки, также возникающее в связи с этим, требует специального изучения.

По данным Nyatt и соавт. [10], клетки пучковой зоны коры надпочечников морских свинок в основном локализируются в области градиента плотности 1,025 г/см³. Клетки сетчатой зоны сосредотачиваются в области 1,050 г/см³. Адrenокортикоциты клубочковой зоны надпочечников крыс занимают диапазон плотностей 1,062—1,074 г/см³ [8]. В наших исследованиях почти все клетки ткани коры надпочечников собирались в IV фракции градиента в диапазоне плотности 1,028—1,056 г/см³. Хотя эта фракция имеет не вполне гомогенный вид, что заметно на рис. 1, разделения клеток по их исходной принадлежности в данном градиенте плотности не происходит.

Содержание липидных капель, определяющее плавучую плотность клеток, по мнению исследователей группы Tait, является специфической характеристикой клеток разных зон. Мы склонны считать, что содержание липидных капель характеризует вероятнее всего функциональное состояние клеток, и активный стероидогенез будет повышать плотность клеток вследствие расщепления эфиров холестерина. Ультрамикроскопическое изучение IV фракции градиента показало, что выделенные клетки не имеют четких признаков зональности. Вместе с тем состояние стероидсинтезирующих органелл свидетельствует о различной функциональной активности выделенных клеток. При биосинтезе гормонов из депонированных в клетках эфиров холестерина следует ожидать значительного изменения плотности клеток и их локализации в градиенте. Однако возможность очистить адrenокортикоциты от других типов клеток в градиенте представляется очень ценным и перспективным методологическим подходом.

PREPARATION AND FRACTIONATION OF THE GUINEA PIG ADRENAL CORTEX CELLS IN THE PERCOLL GRADIENT AND CHARACTERISTIC OF THEIR FUNCTIONAL STATE

N. D. Tronko, V. M. Pushkariov, T. I. Bogdanova,
Yu. Yu. Sautin, A. S. Mikosha

Suspension of isolated adrenal cells from the guinea pig adrenals was prepared using two modifications of collagenase dispersion. The cells separated by percoll density gradient gave 4 bands. The fraction of adrenocorticytes has buoyant density of 1.03-1.05 g/ml. The lower bands comprise blood cells with density of 1.07-1.10 g/ml. The aldosterone content in the adrenocorticyte fraction is 1200-1300 pg/10⁵ cells. Intensity of labelling of cellular proteins increases only in the adrenocorticyte fraction in response to a rise in K⁺ concentration in incubation medium. The Scatchard plot method was used to characterize binding of ¹²⁵I-ACTH to dispersed adrenocortical cells. Binding association constant (K_d) and binding capacity (B_{max}) are 1.3×10⁸ M⁻¹ and 2.0×10⁻⁹ mol/l, respectively. A relation between functional activity of adrenocortical cells, their ultrastructural features and density is discussed.

Institute of Endocrinology and Metabolism,
Ministry of Public Health of the Ukrainian SSR, Kiev

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Богданова Т. И. О возможных механизмах выведения кортикостероидов в коре надпочечных желез // Вопросы морфологии ЦНС: Материалы респ. науч. конф. Киев: Изд-во МЗ УССР, 1984.— С. 16.
2. Мак-Конки Э. Фракционирование РНК путем центрифугирования в сахарозном градиенте // Методы исследования нуклеиновых кислот.— М.: Мир, 1970.— С. 127—138.
3. Пеккель В. А. Обработка результатов биохимических исследований с помощью программируемых калькуляторов // Лаб. дело.— 1987.— № 5.— С. 344—354.