

23. *Grimelius L.* A silver nitrate stain for α_b cells humen pancreatic islets // *Acta Soc. Med. upsaliensis.*— 1968.— 73, N 5—6.— P. 243—270.
24. *Grube D., Forsman W.* Morphology and function of the enteroendocrine cells // *Horm. metab. Res.*— 1979.— 11, N 9.— P. 589—606.
25. *Kaduc B., Hüuser H.* Morphologische Veränderungen der Magenmucosa von Ratten nach chronischer Antazidgabe // *Z. Gastroenterol.*— 1980.— 18, N 3.— S. 138—147.
26. *Katič V., Klisič L., Ivič M.* Effects on repeated calcium and prostigimime treatment on G-cells of antral gastric mucosa in white rats // *Acta med. jugosl.*— 1981.— 35, N 5.— P. 325—333.
27. *Siess E. A., Wieland O. H.* Decrease by glucagon in peroxide generation by isolated hepatocytes // *FEBS Lett.*— 1984.— 177.— P. 6—10.
28. *Takeuchi K., Johnson L. P.* Pentagastrin protects against stress ulceration in rats // *Gastroenterology.*— 1979.— 76, N 2.— P. 327—334.

Ин-т физиологии им. А. А. Богомольца
АН УССР, Киев

Материал поступил
в редакцию 31.10.89

УДК 577.17+612.4

М. Е. Басмаджян, В. И. Геворкян, М. Л. Овсепян, И. М. Мартиросян

Продолжительность синтеза гормонов культурами эндокринных клеток плода человека

Долгое время считалось, что синтез гормонов эндокринными клетками регулируется нейрогуморальными факторами крови, и при культивировании этих клеток *in vitro* они теряют свою основную функцию — синтез гормонов. Однако с применением высокочувствительного радиоиммунологического метода определения гормонов это мнение было опровергнуто. Некоторыми авторами [4, 8—13] было отмечено сохранение гормонсинтезирующей способности эндокринных клеток первичнотрипсинизированных культур вне организма. Но, к сожалению, срок жизнедеятельности первичнотрипсинизированных культур ограничен, чем объясняется не только угасание, но и полное прекращение синтеза гормонов к моменту физиологической гибели эндокринных клеток *in vitro* [5—7, 9, 10, 12, 13].

Ранее нами была проведена работа по определению выживаемости вне организма культур эндокринных клеток поджелудочной железы плода человека с сохраненной функциональной способностью [1, 2]. Положительные результаты по гормональному синтезу долгоживущими *in vitro* β -клетками поджелудочной железы послужили основанием для проведения аналогичных работ в отношении клеток других эндокринных желез (щитовидной железы, надпочечников, семенников) плода человека.

Методика

Исследования проведены на долгоживущих культурах эндокринных клеток, полученных многократным пассированием *in vitro*. Исходным материалом для пассирования служили первичнотрипсинизированные культуры клеток поджелудочной, щитовидной железы, надпочечников и семенников.

Культуры клеток получали по общепринятой методике из эндокринных желез 14—26-недельного плода человека. Для пассирования отбирали культуры с хорошо сформированным монослоем. Накануне посева в сливах отобранных культур радиоиммунологическим методом определяли уровень гормональной активности. В опыте использовали культуры с высокой гормональной активностью. Дезагрегацию клеточного монослоя проводили в термостате при температуре 37°C раствором Варсена до полного разрыхления монослоя. Взвесь клеток осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин. Супернатант сливали, а осадок ресуспендировали свежей ростовой средой и засевали во флаконы.

Посевную дозу и интервалы между пассажами определяли в зависимости от задач эксперимента. Рекультивирование эндокринных клеток во флаконах проводили с добавлением в питательную среду кондиционированной среды соответствующих культур в соотношении 1:1. Морфофункциональное состояние клеток изучали микроскопированием стационарных препаратов после их специфического окрашивания. Гранулы инсулина в β -клетках поджелудочной железы идентифицировали альдегидфуксиновым окрашиванием. Свободные липиды в клетках семенников и надпочечников выявляли с помощью судановых красителей 3—4 и суданового черного. Коллоид клеток щитовидной железы — азокарминовым красителем. Гормонсинтезирующую способность клеток субкультур различных эндокринных желез во всех пассажах подтверждали наличием гормонов в пробах культуральной среды радиоиммунологическим методом.

Результаты и их обсуждение

При витальной микроскопии пассируемых клеток эндокринных желез чело­века в первые часы культивирования отмечалось прикрепление к стеклу и распластывание клеток. К концу второй недели, вследствие интенсивного размножения клеток, формировался монослой.

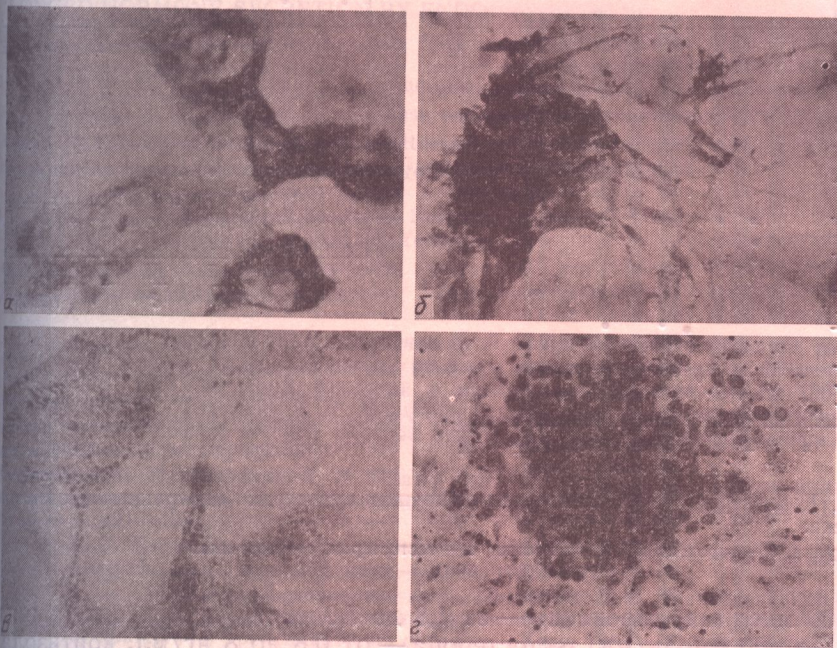


Рис 1. Клетки монослоя субкультур эндокринных желез:

а — β -клетки поджелудочной железы в культуре ткани I пассажа (5 сут, окраска альдегидфуксином, $\times 600$); б — клетки щитовидной железы в культуре ткани III пассажа (17 сут, окраска анилиновыми красителями, $\times 300$); в — клетки Лейдига в культуре ткани семенника III пассажа (5 сут, окраска судановым черным, $\times 600$); г — клетки надпочечника в культуре ткани I пассажа (10 сут, окраска гематоксилином и эозином, $\times 160$).

Формирование монослоя происходило за счет деления прикрепившихся клеток, размножения мигрирующих клеток и прикрепившихся микроколоний. Монослой субкультур эндокринных желез обычно представлен клетками смешанного типа (рис. 1). Эндокринные клетки первичных культур удавалось сохранить регулярной сменой ростовой среды в течение 30—40 сут, после чего, как правило, отмечали дегрануляцию, вакуолизацию клеток и, наконец, отслоение их от стекла.

Подобных явлений не было при своевременных регулярных пересевах эндокринных клеток. Сокращение интервалов между пассажами давало возможность молодым функционально сохраненным клеткам активно размножаться и функционировать после очередного пересева. Во время субкультивирования часть агрегированных клеток образовывала плавающие во взвеси колонии. Прикрепившиеся к стеклу клетки

размножались, формируя на стекле микроколонии, которые постепенно приобретали вид многослойных очагов. Многослойные симпласты часто отслаивались от стекла и продолжали функционировать во взвеси. Специфическая окраска постоянных препаратов культур эндокринных эмбриональных клеток различных пассажей показала вариабельность функционального состояния клеток в момент цитологического изучения.

Морфологическое состояние клеток коррелировало с функциональным содержанием гормонов в культуральной среде (рис. 2). Как видно из рисунка, концентрация инсулина (при идентичных плотности монослоя и возрасте культур) от пассажа к пассажу колеблется от 200

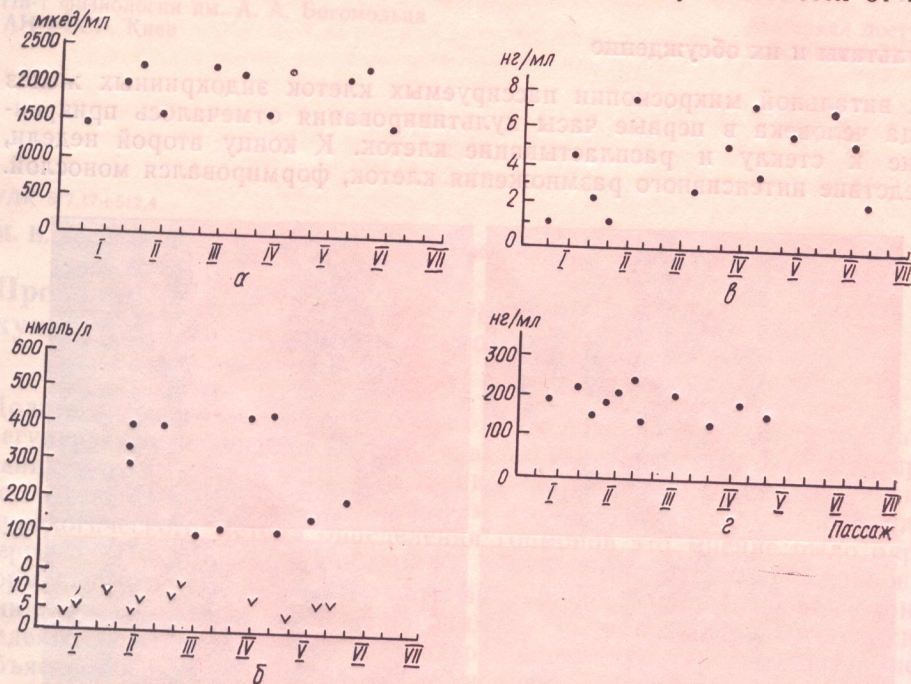


Рис. 2. Концентрация гормонов в долгоживущих культурах эндокринных клеток плода человека:

а — инсулин, б — тироксин и трийодтиронин, в — тестостерон, г — кортизол.

до 2500 мкед/мл, тироксина — от 1,8 до 7,0 нмоль/л, трийодтиронина — от 94 до 600 нмоль/мл, тестостерона — от 0,8 до 8 нг/мл, кортизола — от 140 до 250 нмоль/л.

Таким образом, при регулярном пассировании эндокринные клетки стабильно синтезируют гормон в культуральную среду на уровне всех пассажей. Как правило, на протяжении двух недель с момента очередного пересева идет нарастание концентрации гормонов, но к концу месяца значения этого показателя снижаются. Такая закономерность прослеживается от пассажа к пассажу для клеток всех эндокринных желез. Однако следует отметить, что на 7—10-м пассажах гормоны почти не определяются, что связано со снижением адгезивных и пролиферативных способностей клеток.

Возникает вопрос, что стимулирует столь продолжительное размножение эндокринных клеток *in vitro* с сохранением гормонсинтезирующей способности. По нашему мнению, вероятно, эмбриональная ткань, обладая большими ростовыми возможностями, способствует продолжительному субкультивированию. При этом, будучи менее дифференцированной, она представлена в основном клетками-предшественниками, которые во время роста и развития проходят все стадии клеточной генерации до зрелых форм. Возможно, пересевы нарушают периоды покоя и стабилизации культур, наступающие в монослое в ре-

зультате действия фактора контактного ингибирования клеток, обязательного для нормальных клеток. т. е. клетки искусственно выводятся из четвертого своего периода — периода естественного отмирания. И, наконец, факторы роста и гормоны, находящиеся в добавляемой кондиционированной среде, сами являются биостимуляторами.

Таким образом, проведенные исследования позволили установить, что при пассировании эндокринных клеток плода человека они не утрачивают способности синтезировать гормон в условиях культивирования *in vitro*. Такие культуры могут служить объектом для изучения структуры и функции эндокринных клеток, взаимоотношений отдельных эндокринных клеток, для выяснения особенностей внутриклеточного биосинтеза и метаболизма гормонов без влияния нейрогуморальных факторов организма. Такие культуры могут быть использованы также в трансплантационной экспериментальной эндокринологии.

М. Е. Басмаджян, В. И. Геворкян, М. Л. Овсепян,
И. М. Мартиросян

PROLONGED HORMONE SECRETION BY ENDOCRINE CELLS CULTURES OF HUMAN FETUS

It is stated as possible to cultivate and accumulate endocrine cells by regular passages *in vitro* over a long period of time. In this case endocrine cells of human fetus don't lose the ability to synthesize hormone. Such cultures can be used to study some general-biological problems out of influence of the neurohumoral organism factors.

Branch of the All-Union Research Centre of Surgery,
Academy of Medical Sciences of the USSR, Yerevan

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабикова Р. А., Блюмкин В. Н., Шальнев Б. И. и др. Клеточная культура из поджелудочной железы плодов крупного рогатого скота, полученная с применением коллагелина // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1977. — № 3. — С. 350—353.
2. Басмаджян М. Е., Геворкян В. И. Морфо-функциональная сохранность островковых клеток поджелудочной железы морской свинки при их субкультивировании // Там же. — 1983. — № 3. — С. 83—85.
3. Басмаджян М. Е., Геворкян В. И. Новые аспекты консервации β -клеток поджелудочной железы плодов человека методом регулярных пассажей // Там же. — 1987. — № 10. — С. 491—493.
4. Турчин И. С. Изучение структуры и функции эндокринных желез методом культур тканей: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. — Киев, 1975. — 42 с.
5. Турчин И. С., Тронько И. Д., Минченко А. Г., Онищенко Д. С. Трансплантация культивируемых и некультивируемых клеток коры надпочечников крысам после двухсторонней адренэктомии // Трансплантация органов. — Киев, 1985. — С. 222—224.
6. Шумаков В. И., Блюмкин В. Н. Однослойные клеточные культуры из поджелудочной железы и их гормональная активность // Вопросы трансплантологии и искусственных органов. — М., 1977. — С. 63—67.
7. Федотов В. П., Блюмкин В. Н., Бабикова Р. А. и др. Инсулинообразующая активность однослойных культур островковых клеток поджелудочной железы крупного рогатого скота // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 1978. — № 8. — С. 235—238.
8. Andersson A., Bore H., Groth C. et al. Survival of isolated human islets of Langerhans maintained of tissue culture // J. Clin. Invest. — 1976. — N 57. — P. 1295—1301.
9. Berni A., Fillipini A., Custureri F. et al. L. trapianto cellulare di ghiandola surrenale // Policlinico Sez. chir. — 1979. — 86, N 5. — P. 1044—1046.
10. Eayet G., Housepian S. Demonstration of growth in porcine thyroid cell culture // Ann. endocrinol. — 1979. — 40, N 5. — P. 26—29.
11. Cooke B. A., Aldred L. F., Hunter M. G. et al. Effect of isolation and purification procedures on the viability and properties of tastsis Leydig cells // J. Steroid Biochem. — 1983. — 19, N 1A. — P. 359—366.
12. Newland P., White M. C., Watson M., Kendall-Taylor P. Porcine testicular cells in monolayer cell culture. A model for the study of Leydig cell function // J. Endocrinol. — 1987. — 110—112. — P. 19—23.
13. O'Connor M. K., Malone J. F., Cullen M. S. Long-term cultures of sheep thyroid cells // Acta Endocrinol. — 1980. — 93, N 231. — P. 44—49.

Ереван. филиал Всесоюз.
науч. центра хирургии АМН СССР

Материал поступил
в редакцию 09.12.88