

О. П. Потиха, И. С. Турчин, Н. Д. Тронько

Цитологическая и гормональная характеристика клеточных культур из семенников новорожденных поросят

Последнее десятилетие в нашей стране успешно развивается новое направление лечения эндокринопатий, основанное на трансплантации культур клеток и тканей соответствующих эндокринных желез [1, 2, 5—7]. Для успешного решения этой проблемы необходимо иметь высококачественные культуры эндокринных клеток, способных к пролиферации и продукции специфических гормонов.

В связи с этим основной задачей нашей работы было разработать методику выделения и культивирования клеток семенников новорожденных поросят, изучить биологические свойства клеточного монослоя (т. е. пролиферацию клеток в нем и способность клеток продуцировать половые гормоны), а также исследовать влияние хорионического гонадотропина на структуру и гормональную активность полученной культуры клеток.

Методика

Клеточный монослой получали из 50 семенников новорожденных поросят, которые извлекали в стерильных условиях, декапсулировали, измельчали глазными ножницами на кусочки размером 0,5—1 мм и отмывали охлажденным раствором Хенкса. Затем кусочки ткани диспергировали 0,25%-ным трипсином с помощью магнитной мешалки при температуре 26—28 °С. Разобщенные клетки дважды отмывали охлажденным раствором Хенкса и центрифугировали в течение 15 мин при частоте 1200—1500 мин⁻¹. Полученную взвесь изолированных клеток и клеточных конгломератов помещали в пробирки на сплошные пластинки размером 0,5 см×1 см из расчета 600—800 тыс. в 1 мл питательной среды. Культивировали клетки при температуре 37 °С в питательной среде, состоящей из равных объемов среды 199, гидролизата и лактальбумина (с добавлением 15—20 % инактивированной сыворотки крупного рогатого скота и пенициллина из расчета 100 ед/мл среды). Смену питательной среды проводили каждые три дня. Рост клеток исследовали при просматривании их через стенку пробирки на световом микроскопе. Для

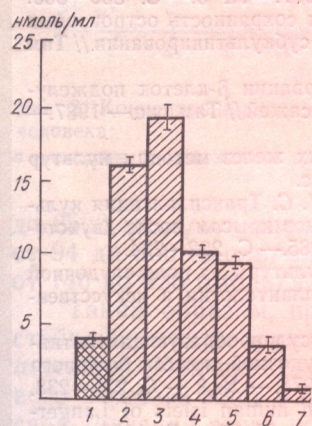


Рис. 1. Влияние различных концентраций хорионического гонадотропина на продуцирование тестостерона (нмоль/мл) клетками культуры ткани семенников новорожденных поросят:

1 — норма; 2 — 0,025; 3 — 0,1; 4 — 0,25; 5 — 1,0; 6 — 1,5; 7 — 3,0 ед/мл.

цитологического анализа клетки фиксировали 96-градусным этиловым спиртом каждые 24 ч, начиная с момента посева, и в течение месяца.

Продукцию тестостерона в культуре определяли радиоиммунологическим методом, используя стандартный набор «Стерон Т¹²⁵I». Влияние хорионического гонадотропина на культуру клеток изучали с помощью его различных концентраций (рис. 1). Общие липиды выявляли суданом черным [3].

О гормональной активности клеточной культуры судили по активности фермента интерстициальных клеток 3-β-окистероиддегидрогеназы, определяемой с помощью модифицированного метода Суриной [4].

Результаты и их обсуждение

Через 2 ч после посева клеток, обнаружена их способность прикрепляться к стеклу и слюдяным пластинкам. Видны изолированные светлые клетки и конгломераты, состоящие из 6—8 и нескольких десятков клеток. В первые 4—5 сут наблюдается интенсивный прирост числа клеток за счет размножения изолированных и мигрирующих из «материнских» конгломератов клеток. Спустя 5—6 сут после начала культивирования в большинстве случаев наблюдается образование сплошного

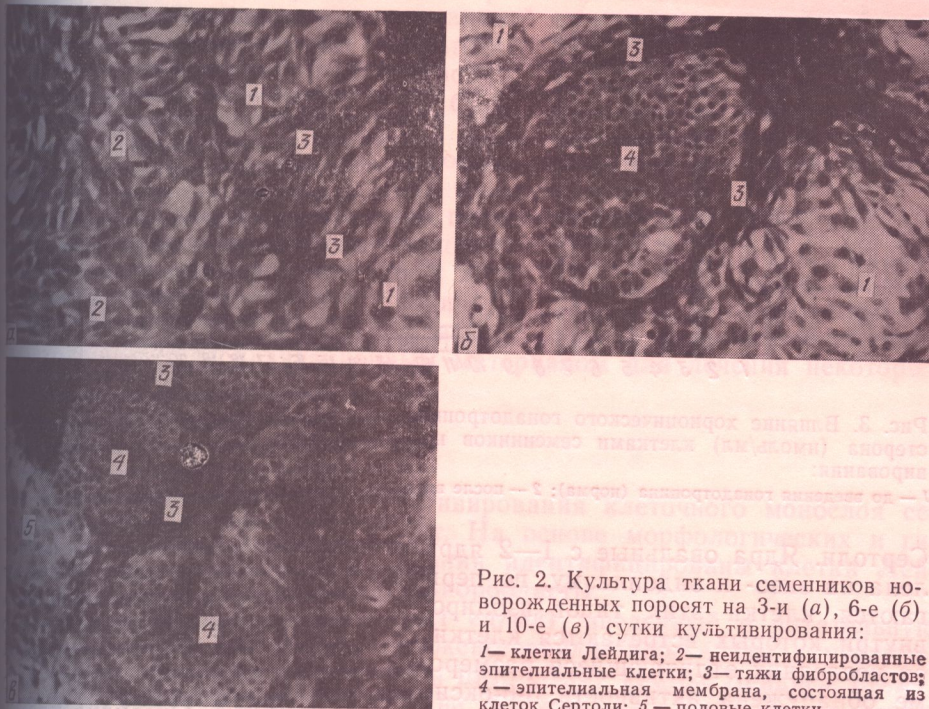


Рис. 2. Культура ткани семенников новорожденных поросят на 3-й (а), 6-е (б) и 10-е (в) сутки культивирования:

1—клетки Лейдига; 2—неидентифицированные эпителиальные клетки; 3—тяжи фибробластов; 4—эпителиальная мембрана, состоящая из клеток Сертоли; 5—половые клетки.

клеточного монослоя и культура приобретает вид, характерный для культуры клеток семенников не только новорожденных поросят, но и других животных [8]. На этом этапе развития клеточного монослоя хорошо идентифицируются различные типы клеток (рис. 1—2). В основном они представлены фибробластами, которые располагаются в виде тяжей или отдельных групп. Иногда они образуют разнонаправленные «завихрения». Клетки подобных тяжей небольшого размера, имеют удлинённую цитоплазму, овальные или вытянутые гиперхромные ядра с несколькими ядрышками.

Среди тяжей фибробластов обнаружены клетки полигональной формы с полиморфными гиперхромными ядрами, расположенными чаще эксцентрично. Хроматин в виде размытых глыбок, расположен равномерно по всему ядру. Цитоплазма этих клеток эозинофильная, компактная. На основании морфологических признаков (полиморфизма ядер, эксцентричности их расположения, компактности цитоплазмы) эти клетки можно отнести к половым клеткам. Следует подчеркнуть, что они располагаются изолированно или небольшими группами по 3—6 клеток, и составляют примерно 5—8 % всего клеточного состава культуры.

В клеточном монослое семенников выявлены также клетки, которые имеют свойства эпителиальных. Находятся они чаще среди «материнских» клеточно-тканевых конгломератов или между рыхло расположенными фибробластами. Клетки этой группы имеют полигональную форму, тесно примыкают друг к другу, образуют эпителиальные «мембраны». Ядра этих клеток имеют округлую или овальную форму

с неровными краями, содержат несколько плотных ядрышек. Цитоплазма этих клеток рыхлая, вакуолизированная и содержит значительное число липидных включений. По своим морфологическим признакам они, вероятно, представляют собой клетки Сертоли.

Клетки Лейдига. 10—12 % их представлены следующими двумя типами клеток: эпителиальными и фибробластоподобными. В клетках обоих типов обнаружена активность фермента 3- β -оксистероиддегидрогеназы, указывающего на способность этих клеток синтезировать половые гормоны. Клетки эпителиального типа размером больше клеток

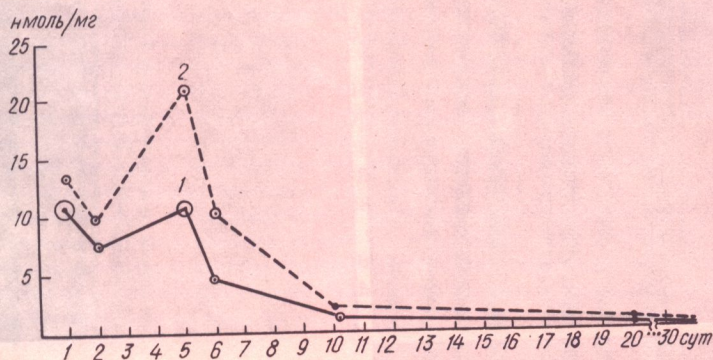


Рис. 3. Влияние хорионического гонадотропина (0,1 ед/мл) на продуцирование тестостерона (нмоль/мл) клетками семенников новорожденных поросят за время культивирования:

1 — до введения гонадотропина (норма); 2 — после введения гонадотропина.

Сертоли. Ядра овальные с 1—2 ядрышками. Цитоплазма четко разделена на экзо- и эндоплазму, по периферии вакуолизирована. Располагаются клетки этих типов изолированно или небольшими группами, внутри которых встречаются клетки, напоминающие фибробласты, но от последних отличающиеся размером и формой ядра. В их цитоплазме обнаружена активность 3- β -оксистероиддегидрогеназы, однако она ниже, чем в цитоплазме клеток эпителиального типа. Очевидно клетки Лейдига эпителиального и фибробластоподобного типов проявляют различную гормональную активность. В цитоплазме клеток Лейдига обоих типов выявлены липидные включения.

Кроме вышеописанных типов клеток встречаются эпителиальные клетки различной формы и размера, ядра которых крупные и содержат несколько ядрышек. Однако определить их тканевую принадлежность не представлялось возможным. Можно предположить, что они относятся к эндотелию сосудов или лимфоидной системы.

Такой цитологический вид клеточный монослой семенников сохраняет примерно до 10—14 сут, начиная с момента культивирования. А затем наступают деструктивные изменения, преимущественно в половых клетках. Характер роста изменяется лишь в зависимости от начального преобладания того или другого клеточного состава. Встречаются препараты с обширными «мембранами» клеток типа Сертоли (60—70 %), или с типичными фибробластами (в основном), что зависит от исходного клеточного состава при посеве клеточной суспензии. К 22—24-ым суткам в препаратах преобладают фибробласты, которые интенсивно размножаются и вытесняют другие типы клеток.

Известно, что гонадотропные гормоны стимулируют половую систему экспериментальных животных и человека. Под влиянием гонадотропина (0,1 ед/мл), введенного в питательную среду, уже в первые часы после введения обнаружено увеличение ядрышек и ядер клеток Лейдига, общего числа клеток Лейдига и липидных капель в их цитоплазме [9, 12]. В дальнейшем набухает вся клетка. Так, если в контрольной культуре на 100 клеток обнаружено 6—8 клеток Лейдига, то в опыте — 16—18. Под действием гормона клетки Лейдига фибробла-

стоподобного типа приобрели свойства эпителиальных, что указывает на их высокую гормональную активность и подтверждается результатами определения активности 3- β -оксистероиддегидрогеназы. Под действием хорионического гонадотропина увеличивается и число половых клеток.

Интересные результаты получены при изучении прямого влияния хорионического гонадотропина на продукцию тестостерона клеточным монослоем семенников новорожденных поросят. Предварительно было показано, что концентрация гонадотропина, составляющая 0,1 ед/мл, наиболее оптимальна для максимальной стимуляции продукции тестостерона. Как видно из рис. 3, клеточный монослой продуцирует тестостерон в течение 1 мес и гонадотропный гормон стимулирует этот процесс. Подобные культуры клеток были получены и другими авторами [10, 11], однако они не проводили детального цитологического анализа по типам клеток в клеточном монослое семенников экспериментальных животных.

Таким образом, в результате проведенных исследований показано, что клеточные культуры семенников новорожденных поросят способны не только к пролиферации, но и к продукции тестостерона, которая усиливается под влиянием хорионического гормона. Считаем, что 5—8-суточные культуры семенников новорожденных поросят могут быть подходящим трансплантационным материалом для лечения некоторых эндокринных нарушений.

Выводы

1. Разработана методика культивирования клеточного монослоя семенников новорожденных поросят. На основе морфологических и гистохимических методов исследования идентифицированы клетки Лейдига, Сертоли, половые клетки и фибробласты.
2. Гонадотропный гормон (0,1 ед/мл), введенный в питательную среду, повышает активность 3- β -оксистероиддегидрогеназы и увеличивает число липидных включений в цитоплазме клеток Лейдига, стимулирует их размножение и выделение тестостерона в питательную среду.
3. Полученная нами культура клеток может быть использована в клинической практике для лечения некоторых форм гипогонадизма.

O. P. Potykha, I. S. Turchin, N. D. Tronko

CYTOLOGIC AND HORMONAL CHARACTERISTICS OF CELL CULTURE FROM NEONATAL PIG TESTES

A cell culture of neonatal pig testes has been studied. Leydig cells, Sertoli cells, sex cells and fibroblasts have been identified by cytologic and cytochemical research methods. Gonadotropin concentration (0.1 U/ml) of nutritional medium, increases proliferation of the Leydig cells and increases their 3- β -ol-steroiddehydrogenase activity as well as increases amount of lipid inclusions and stimulates testosterone production. The cell culture can be used to treat some forms of hypogonadism.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Беникова Е. А., Турчин И. С., Большова Е. В. и др. Опыт лечения детей, страдающих сахарным диабетом, при помощи алло- и ксенотрансплантации культуры островковых клеток поджелудочной железы // Пробл. эндокринологии. — 1987. — 33, № 2. — С. 19—22.
2. Комиссаренко В. П., Турчин И. С., Комиссаренко И. В. и др. Трансплантация культуры островковых клеток поджелудочных желез плодов человека и животных как метод лечения сахарного диабета // Врачеб. дело. — 1983. — № 4. — С. 52—57.
3. Роскин Г. И., Левинсон А. Б. Микроскопическая техника. — М.: Медицина, 1957. — 180 с.

4. Сурина М. Н. Выявление 3- β -ол-дегидрогеназы в коре надпочечников крыс // Пробл. эндокринологии. — 1967. — 13, № 4. — С. 56—59.
5. Шалимов С. А., Кейсевич Л. В., Подпратов С. Е. и др. Аллотрансплантация поджелудочной железы в клинике // Клин. хирургия. — 1982. — № 5. — С. 54.
6. Шумаков В. И., Блюмкин В. Н., Игнатенко С. Н. и др. Результаты трансплантации культур островковых клеток поджелудочной железы больным сахарным диабетом // Пробл. эндокринологии. — 1985. — 31, № 5. — С. 67—70.
7. Шумаков В. И., Блюмкин В. Н., Игнатенко С. Н. и др. Трансплантация культур островковых клеток поджелудочной железы плодов человека больным сахарным диабетом // Клин. медицина. — 1983. — № 2. — С. 46—51.
8. Zenzes M. T., Engel W. The capacity of testicular structures // Differentiation. — 1981. — 20, N 2. — P. 157—161.
9. Bernier M., Gibb W., Saez Y. M. et al. The 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase activity of cultured porcine Leydig cells in primary culture / Can. J. Physiol. and Pharmacol. — 1984. — 62, N 10. — P. 1300—1303.
10. Meidan R., Lim P., McAllister J. M., Hsueh A. J. W. Hormonal regulation of androgen biosynthesis by primary cultures of testis cells from neonatal rats / Endocrinology. — 1985. — 116, N 6. — P. 2473—2482.
11. Erickson L. A., Davis J. C., Burton P. R., Snyder J. Correlative light and electron microscopy of dissociated immature rat testicular cells undergoing morphogenesis in vitro / J. Embryol. and Exp. Morphol. — 1980. — 60. — P. 283—293.
12. Kerr J. B., Robertson D. M., de Kretser D. M. Morphological and functional characterization of interstitial cells from mouse testes fractionated on Percoll density gradients / Endocrinology. — 1985. — 116, N 3. — P. 1030—1043.

Киев. науч.-исслед. ин-т
эндокринологии и обмена веществ УССР

Материал поступил
в редакцию 09.10.89

УДК 615.322:612.014.1:619

В. М. Гордиенко, Е. Л. Мишенкова, А. А. Радзиевский

Патоморфологическая характеристика действия на организм противоопухолевого антибиотика астерина в условиях стресса

Стресс-реакция организма, первоначально носящая приспособительный характер, при высокой интенсивности действия раздражителя или при его большой продолжительности, приводит к формированию патологических изменений в органах и системах организма. Наиболее выражены начальные биохимические и морфологические изменения, происходящие в коре надпочечников [3], проявляющиеся в гипертрофии спонгиозитов и гиперсекреции ими глюкокортикоидных гормонов [4]. Решающая же роль нейрогормональных механизмов целостного организма при стрессе сопряжена с повреждениями структур различных отделов головного мозга. Кроме того, вследствие относительно быстро возникающих при стрессе сдвигов липидного состава биомембран клеток, особенно в легких, изменяется их структура [2, 3].

В настоящем сообщении представлены результаты морфологического изучения структурных постстрессорных изменений в надпочечниках, коре головного мозга и легких при действии нового противоопухолевого антибиотика астерина¹, полученного из растения семейства Asteraceae.

Методика

Эмоционально-болевого стресс (ЭБС) воспроизводили подвешиванием половозрелых беспородных крыс массой 120—160 г на 18 ч за шейную кожную складку. Животным подопытной группы изучаемый антибиотик (50 мг/кг) вводили однократно перорально за

¹ Препарат получен в Институте микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного АН УССР А. С. Бондаренко — ведущим научным сотрудником отдела антибиотиков, возглавляемого акад. АН УССР В. В. Смирновым.