

ЗАКОНОМЕРНЫЕ ПРОЦЕССЫ ЭМБРИОНАЛЬНОГО И ПОСТНАТАЛЬНОГО ГИСТОГЕНЕЗА

Адоева Е. Я.

ЭНДОКРИННЫЕ КЛЕТКИ В ОРГАНИЧЕСКИХ КУЛЬТУРАХ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСЫ

*Кафедра биологии (заведующий — проф. А. Ф. Никитин)
Военно-медицинской академии им. С. М. Кирова, Санкт-Петербург,
e-mail: adoeva@mail.ru*

Органотипическое культивирование занимает промежуточное положение между экспериментами на животных и на культурах клеток. Из имеющихся в настоящее время методических приемов органические культуры лучше всего удовлетворяют требованиям по длительному поддержанию дифференцировки клеток *in vitro*. В работах отечественных и зарубежных авторов описаны методики получения и культивирования экзокринных и эндокринных клеток, а также изолированных островков поджелудочной железы млекопитающих и человека [2, 3, 4, 5, 6].

Цель исследования — изучить структурно-функциональные изменения эндокринных клеток поджелудочной железы эмбрионов крысы в процессе органотипического культивирования.

Материал и методы. В стерильных условиях извлекали поджелудочную железу 20-суточных эмбрионов крыс, промывали ее в растворе Хэнкса с антибиотиками (по 300 ЕД/мл пенициллина и 300 мкг/мл стрептомицина) и разрезали на кусочки с размером сторон 1–2 мм. Культивирование проводили по методу множественных органических культур [1]. В стеклянную чашку Петри помещали пластмассовую платформу с отверстиями для фильтров. Мембранные фильтры с размером пор 40 мкм (фирма «Synpro», ЧССР) разрезали на кусочки и помещали в отверстия платформы таким образом, чтобы они нижней поверхностью соприкасались с питательной средой, а между ней и фильтром не скапливались пузырьки воздуха. Фрагменты эксплантированного материала помещали на мембранные фильтры. Питательная среда имела следующий состав: среда 199–70 %; сыворотка крупного рогатого скота (фирма «Биолот») — 20 %; куриный эмбриональный экстракт — 10 %; аскорбиновая кислота — 0,07 мг/мл; глюкоза — 4 мг/мл; пенициллин — 50 ЕД/мл; стрептомицин — 50 мкг/мл. Культивирование проводили при 36,5–37 °С в термостате с автоматической подачей CO₂ (5 %).

Для электронно-микроскопического исследования органические культуры фиксировали в 2,5 %-ном растворе глутарового альдегида по общепринятым методикам и заливали в аралдит. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III и изучали с помощью электронного микроскопа JFM-7A° при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты и обсуждение. На 20-е сутки эмбриогенеза экзокринный отдел поджелудочной железы крысы представлен почти полностью сформированными концевыми

выми отделами (ацинусами) и выводными протоками. Степень дифференцировки ацинусов центральной и периферической частей железы различна. На периферии железы отмечается высокая митотическая активность клеток эпителия и продолжается образование концевых отделов. Эндокринная часть представлена островками. В островках преобладают В-клетки, в цитоплазме которых формируются многочисленные гранулы секрета. На периферии островков встречаются одиночные агранулярные клетки, которые по расположению соответствуют А-клеткам.

Из литературы известно, что в развитии органных культур выделяют, как правило, три периода: адаптации; пролиферации и дифференцировки; дегенерации [1]. В органных культурах сохраняются межклеточные взаимодействия и в течение долгого периода времени поддерживается гистологическая и биохимическая дифференцировка. После начальной травмы, связанной с эксплантацией, образуются центральные некрозы. В периферической части эксплантатов сохраняются жизнеспособные ткани, и в дальнейшем органные культуры остаются, как правило, в нерастающем равновесном состоянии в течение нескольких дней и даже недель.

В органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы на протяжении 9–10 суток культивирования длится период адаптации. Он сопровождается дистрофическими и некротическими процессами в культурах. К этому времени выживают $66,7 \pm 13,6$ % эксплантатов. Затем следует период пролиферации и дифференцировки, который длится с 11-х по 17-е сутки культивирования, сопровождается интенсивным делением клеток, продукцией секреторных белков и формированием секреторных гранул, а также характеризуется относительным постоянством доли развивающихся эксплантатов. На 17-е сутки отмечается выраженное снижение выживаемости эксплантатов ($22,2 \pm 9,8$ %; $p < 0,05$). Период дегенерации или старения культур начинается через 17–18 суток культивирования и заканчивается гибелью эксплантатов. Однако и через 30 суток культивирования жизнеспособными остаются $16,7 \pm 8,8$ % эксплантатов.

Морфология развивающихся культур характеризуется следующими особенностями. Через 9–10 суток культивирования центральные участки большинства эксплантатов некротизированы. Жизнеспособный эпителий сохраняется в периферической части эксплантатов. Здесь часть ацинусов подвергается структурно-функциональной перестройке, результатом которой является образование эпителиальных трубок, сходных с первичными трубками раннего этапа эмбрионального гистогенеза поджелудочной железы (рис. 1, а). Эндокринные клетки образуют отдельные скопления по периферии эксплантатов. В цитоплазме В-клеток выявляются секреторные гранулы различной степени зрелости.

Период пролиферации и дифференцировки в эксплантатах поджелудочной железы характеризуется следующими ультраструктурными особенностями клеток. Эпителиоциты трубок содержат крупные, овальной формы ядра. Цитоплазма бедна органоидами. Шероховатая эндоплазматическая сеть представлена одиночными канальцами и пузырьками. Митохондрии мелкие, овальной или округлой формы, содержат редко расположенные кристы, матрикс умеренной электронной плотности. Комплекс Гольджи зачастую развит, много свободных рибосом и полисом. Местами на периферии эксплантатов выявляются признаки перестройки эпителиальных трубок в ацинусы, т. е. начало вторичной дифференцировки

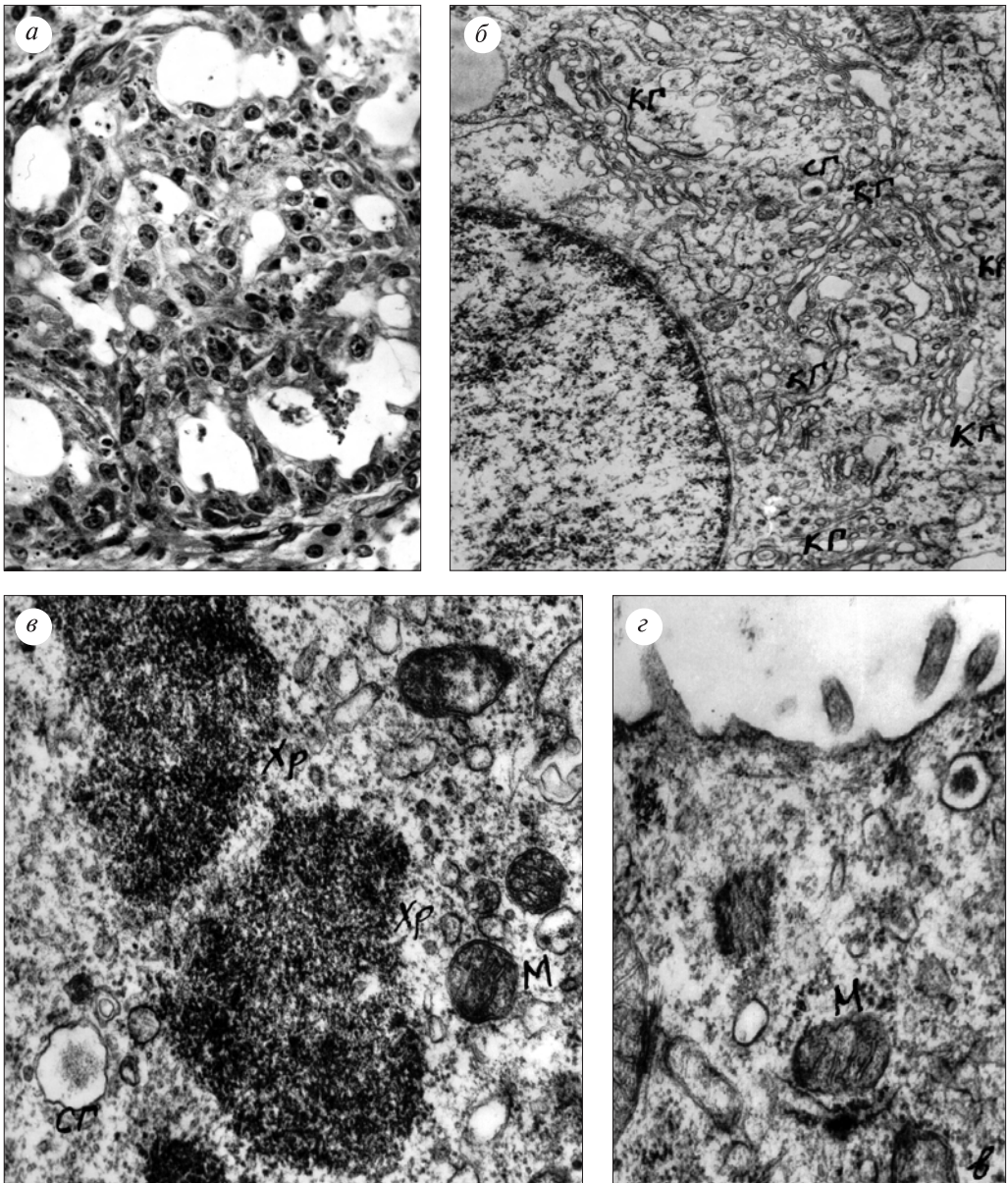


Рис. 1. Эндокринные клетки в органных культурах поджелудочной железы эмбрионов крысы:

a — периферическая зона эксплантата, окраска гематоксилином и эозином;

б — участок В-клетки; *в* — митоз в малодифференцированной В-клетке;

г — В-клетка в составе эпителиальной трубки.

Я — ядро; М — митохондрии; Хр — хромосомы;

СГ — секреторные гранулы; КГ — комплекс Гольджи.

Ув.: *a* — об. 20, ок. 10; *б* — 22000X; *в* — 69000X; *г* — 41000X.

Сроки культивирования: *a* — 11 суток; *б* — 12 суток; *в* и *г* — 9 суток

секреторного экзокринного эпителия. Вблизи эпителиальных трубок отмечаются скопления эндокринных клеток. Цитоплазма В-клеток характеризуется хорошо развитой шероховатой эндоплазматической сетью. Она образована короткими канальцами и небольшими вакуолями, на мембранах которых находятся связанные рибосомы. Элементы эндоплазматической сети рассеяны равномерно по всей цитоплазме. Имеется также значительное число свободных рибосом, расположенных поодиночке или в виде полисом. В клетках выявляются многочисленные секреторные гранулы различной степени зрелости. Отмечается гипертрофия и гиперплазия комплекса Гольджи, представленного большим числом цистерн, крупных и мелких вакуолей, в которых происходит интенсивное формирование и созревание гранул секрета (рис. 1, б). Тесный контакт гранул с плазмолеммой свидетельствует об активном выведении секрета. В некоторых В-клетках встречаются митозы (рис. 1, в). Отмечается появление В-клеток в составе эпителиальных трубок (рис. 1, г).

Через 17 суток культивирования в эксплантатах появляются обширные периферические некрозы, большая часть ацинусов погибает. Менее подвержены дистрофическим изменениям малодифференцированные клетки эпителиальных трубок и выводных протоков. В цитоплазме В-клеток выявляются многочисленные секреторные гранулы. Прослежены разные стадии формирования секрета.

Таким образом, в органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы происходит структурно-функциональная перестройка ацинусов в эпителиальные трубки, которые сохраняют способность к росту и вторичной дифференцировке. Из инсулоцитов функционально активными во все сроки исследования остаются В-клетки. В них наблюдаются активные процессы гормонообразования и выведения секрета. Источниками образования новых инсулоцитов в органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы являются: 1) малодифференцированные инсулоциты в составе эпителиальных трубок; 2) пролиферирующие эндокринные клетки.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Лурия Е. А.* Кроветворная и лимфоидная ткань в культурах. М.: Медицина, 1972.
2. *Обидина М. Ю.* Реактивность эпителия эмбриональной поджелудочной железы при действии метилнитрозомочевины в органоидной культуре // Факторы внешней среды и человек. Л., 1977. С. 67.
3. *Andersson A., Christensen N., Groth C. C., Hellerstrom C., Petersson B., Sandler S.* Survival of human fetal pancreatic explants in organ culture as reflected in insulin secretion and oxygen consumption // *Transplantation*. 1984. V. 37. № 5. P. 499–503.
4. *Bolton W. E., Terrell S. P., Andrews K. L., Boyd J. J.* Preparation of primary monolayer cultures of mouse pancreatic epithelial cells // *J. Tissue Cult. Meth.* 1982. V. 7. № 1. P. 39–42.
5. *Mandel T. E., Carter W. M., Kaelmanta M.* Organ culture of human fetal pancreas for transplantation // *Transplant. Proc.* 1984. V. 16. № 4. P. 1040–1042.
6. *Yao Zhong-Xiang, Qin Mao-Lin, Liu Jian-Jun, Chen Xing-Shu, Zhou De-Shan.* In vitro cultivation of human fetal pancreatic ductal stem cells and their differentiation into insulin-producing cells // *World J. Gastroenterol.* 2004. V. 10. № 10. P. 1452–1456.