

ОРГАНОТИПИЧЕСКОЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ЭМБРИОНАЛЬНОЙ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ КРЫСЫ

Е. Я. Адоева

Военно-медицинская академия им. С.М.Кирова, кафедра биологии, Санкт-Петербург,

adoeva@mail.ru

Проведено длительное органотипическое культивирование эмбриональной поджелудочной железы крысы. В органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы происходит перестройка ацинусов в эпителиальные трубки. Эпителиоциты выводных протоков и эпителиальных трубок активно делятся и претерпевают процесс вторичной секреторной дифференцировки. Можно считать, что образование инсулоцитов в органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы происходит в результате следующих процессов: 1) дифференцировки отдельных эпителиоцитов в составе эпителиальных трубок; 2) пролиферации эндокринных клеток; 3) ацино-инсулярной трансформации эпителия.

Ключевые слова: органные культуры, ацинус, инсулоцит, пролиферация клеток, вторичная дифференцировка, выводные протоки, эпителиальные трубки, ацино-инсулярная трансформация.

В работах отечественных и зарубежных авторов описаны методики получения и культивирования экзокринных и эндокринных клеток, а также изолированных островков поджелудочной железы млекопитающих и человека (1, 2, 3, 4). Из имеющихся в настоящее время методических приемов органные культуры лучше всего удовлетворяют требованиям по длительному поддержанию дифференцировки клеток *in vitro* (5, 6, 7, 8). Они являются чрезвычайно удобными моделями для изучения экзогенных и эндогенных факторов, определяющих ход и направление этого процесса (9, 10, 11, 12, 13). Органотипическое культивирование занимает промежуточное положение между экспериментами на животных и культурах клеток. С одной стороны, органные культуры представляют собой относительно простую систему по сравнению с организмом. Это позволяет исключить опосредованные нейрогуморальные влияния, которые имеют место в целом организме. С другой стороны, в органных культурах осуществляются ограниченное размножение и дифференцировка, аналогичные имеющим место в организме. В качестве источников органных культур чаще всего используются эмбриональные ткани, малодифференцированные клетки которых

быстрее адаптируются к условиям культивирования и обладают большей потенцией роста и развития по сравнению с высокодифференцированными клетками взрослого организма.

Целью нашего исследования было изучение структурно-функциональных изменений экзокринных и эндокринных клеток поджелудочной железы крысы в процессе органотипического культивирования.

Материал и методы

В стерильных условиях извлекали поджелудочную железу 20-дневных 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 органных культур (5). В стеклянную чашку Петри помещали пластмассовую платформу с отверстиями для фильтров. Мембранные фильтры с размером пор 40 мкм (фирма «Synpor», ЧССР) разрезали на кусочки и помещали в отверстия платформы таким образом, чтобы они своей 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 гистологического и гистохимического исследования эксплантаты поджелудочной железы фиксировали по общепринятым методикам в 10-процентном забуференном нейтральном формалине. Срезы получали на ротационном микротоме и окрашивали гематоксилином Карачи с подкраской эозином.

Для исследования динамики синтеза ДНК в клетках эксплантаты инкубировали с ³H-тимидином (отечественного производства, удельная активность 730 ГБк/ммоль). В культуральную среду за час до фиксации эксплантатов вводили радиоактивный тимидин в дозе 3,7x10⁴ Бк/мл. Автографы получали общепринятым способом. На автографах определяли индекс первично меченых ядер (ИПМЯ) — количество меченых ядер на 100 клеток. На этих же срезах подсчитывали митотический индекс (МИ) — количество митозов на 1000 клеток. Статистическую обработку количественных данных проводили с учетом индивидуальной изменчивости признака (14).

Для электронно-микроскопического исследования органные культуры фиксировали в 2,5-процентном растворе глutarового альдегида по общепринятым методикам и заливали в арамидит. Ультратонкие срезы получали на ультратоме LKB-III и изучали с помощью электронного микроскопа JFM-7A^o при ускоряющем напряжении 80 кВ.

Результаты и обсуждение

На 20-й день эмбриогенеза экзокринный отдел поджелудочной железы крысы представлен почти полностью сформированными концевыми отделами - ацинусами. Ядра ацинозных клеток располагаются в базальных отделах цитоплазмы. В цитоплазме клеток отмечается увеличение содержания гранул зимогена, которые локализуются не только в апикальных, но и в базальных отделах цитоплазмы. На субмикроскопическом уровне в цитоплазме клеток выявляется хорошо развитая шероховатая эндоплазматическая сеть. Комплекс Гольджи в ацинозных клетках, завершивших дифференцировку, выражен, как правило, слабо.

Эпителиоциты выводных протоков находятся в состоянии высокой функциональной активности. В них отмечается расширение канальцев шероховатой эндоплазматической сети, гипертрофия комплекса Гольджи, просветление матрикса митохондрий.

В эндокринных островках преобладают В-клетки, в цитоплазме которых содержатся многочисленные гранулы инсулина. Тесный контакт гранул с плазмалеммой указывает на выведение секрета. Особенно интенсивно развивается эндокринный аппарат в последние три дня эмбриогенеза (с 20-го по 23-й день): увеличиваются размеры островков, возрастает количество гранулированных В-клеток. На 20–22-й день на периферии островков появляются А-клетки. К моменту рождения эндокринный аппарат развит у крысы хорошо, но еще не достигает своего дефинитивного состояния.

Из литературы известно, что в развитии органных культур выделяют, как правило, три периода: 1) адаптации, 2) пролиферации и дифференцировки, 3) дегенерации (5). 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 нерастущем 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, гибелью клеток и фагоцитозом продуктов распада. К этому времени выживают $66,7 \pm 13,6\%$ эксплантатов (см. табл. 1). Затем следует период *пролиферации и дифференцировки*, который длится с 11 суток по 17-е сутки культивирования, сопровождается интенсивным размножением клеток, продукцией секреторных белков и формированием секреторных гранул, а также характеризуется относительным постоянством доли развивающихся эксплантатов (см. табл. 1). Полученное снижение этого показателя с $66,7\%$ через 11 суток до $44,4\%$ через 15 суток культивирования недостоверно ($p > 0,05$). Только на 17-е сутки отмечается снижение выживаемости эксплантатов в два раза ($22,2 \pm 9,8\%$; $p < 0,05$). *Период дегенерации* или старения культур начинается через 17–18 суток культивирования и заканчивается гибелью эксплантатов. Однако и через 30 суток культивирования $16,7 \pm 8,8 \%$ эксплантатов остаются жизнеспособными.

Таблица 1.

Выживаемость эксплантатов поджелудочной железы эмбрионов крысы в процессе
органотипического культивирования

($X \pm x$; $n = 12-18$)

Сроки культивирования, сутки	Развивающиеся эксплантаты, %
9	$66,7 \pm 13,6$
11	$66,7 \pm 13,6$
12	$58,3 \pm 14,2$
13	$50,0 \pm 14,4$
15	$44,4 \pm 11,7$
17	$22,2 \pm 9,8$
30	$16,7 \pm 8,8$

Морфология развивающихся культур характеризуется следующими особенностями. Во время *периода адаптации* наблюдаются дистрофические и некротические изменения эпителия. В этой стадии культивирования центральные участки большинства эксплантатов некротизированы. Жизнеспособный эпителий сохраняется в периферической части эксплантатов, а по самому краю кусочков формируется однослойная соединительнотканная или соединительнотканно-эпителиальная капсула, которая сохраняется до конца культивирования. Между центральной и периферической зонами эксплантатов располагается

переходная зона, в которой концевые отделы и выводные протоки находятся на разных этапах дистрофических изменений. Происходит вакуолизация цитоплазмы, фрагментация и пикноз ядер клеток. Часть концевых отделов подвергается некрозу и декомплексации. Во время *периода адаптации* в ацинозных клетках отмечается набухание митохондрий и просветление их матрикса. Кристы митохондрий укорочены, часть из них фрагментируется. В некоторых клетках расширяются канальца шероховатой эндоплазматической сети и образуются крупные вакуоли. В ядрах происходит расширение перинуклеарного пространства; хроматин располагается в виде глыбок у ядерной оболочки. Дистрофические и дегенеративные изменения в равной степени определяются в клетках экзокринного и эндокринного эпителия, а также в стромальных фибробластах. В центральной части эксплантатов и среди некротизирующихся ацинусов встречаются многочисленные макрофаги и лейкоциты, участвующие в фагоцитозе продуктов клеточного распада.

В периферической зоне эксплантатов часть ацинусов подвергается структурно-функциональной перестройке, результатом которой является образование эпителиальных трубок, сходных с первичными эпителиальными трубками раннего этапа эмбрионального гистогенеза поджелудочной железы. В их образовании участвует не только эпителий ацинусов, но и эпителий протоков. Отмечается уплощение ацинозных клеток, в них редуцируется шероховатая эндоплазматическая сеть, исчезают гранулы зимогена. Трубки выстланы кубическими или низкопризматическими эпителиальными клетками, просветы их расширены. В цитоплазме эпителиоцитов отсутствует зимогенная зернистость, присутствует небольшое количество органоидов, которые представлены единичными канальцами шероховатой эндоплазматической сети, свободными рибосомами и полисомами, мелкими митохондриями. Местами среди эпителиальных трубок встречаются дистрофически измененные ацинусы и скопления эндокринных клеток, а также соединительнотканые клетки, образующие «тяжи» между эпителиальными структурами. Структурно-функциональная перестройка эпителия сопровождается усилением его пролиферативной активности.

Период пролиферации и дифференцировки в эксплантатах поджелудочной железы характеризуется следующими особенностями. Через 11 суток культивирования экзокринная паренхима представлена в основном эпителиальными трубками, образованными в результате структурно-функциональной перестройки ацинусов и пролиферации эпителия выводных протоков. Отмечается интенсивный рост трубок. Эпителиоциты приобретают полярное строение. Крупные, овальной формы ядра располагаются в базальной части цитоплазмы.

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 часто слабо развит, много свободных рибосом и полисом.

Результаты изучения некоторых показателей пролиферативной активности эпителиоцитов эмбриональной поджелудочной железы в процессе органотипического культивирования приведены в таблице 2.

Таблица 2.

Изменение показателей пролиферативной активности эпителиоцитов эмбриональной поджелудочной железы крысы в органных культурах
($X \pm x$; $n = 12-18$)

Сроки исследования, сутки	Показатель	
	ИПМЯ, %	МИ, ‰
9	$4,8 \pm 0,9$	$1,9 \pm 0,4$
11	$8,0 \pm 0,5$	$3,3 \pm 0,7$
12	$7,6 \pm 0,6$	$2,0 \pm 0,7$
13	$5,3 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
15	$3,2 \pm 0,1$	0

Примечание: ИПМЯ (индекс первично меченых ядер) — количество меченых ядер на 100 клеток; МИ (митотический индекс) — количество митозов на 1000 клеток.

Эпителиоциты эмбриональной поджелудочной железы крысы на протяжении 15 суток культивирования активно включают радиоактивный ^3H -тимидин и синтезируют ДНК (табл. 2). Через 9 суток культивирования индекс первично меченых ядер (ИПМЯ) составляет $4,8 \pm 0,9\%$. В дальнейшем этот показатель увеличивается через 11 суток культивирования до $8,0 \pm 0,5\%$ ($p < 0,05$) и постепенно уменьшается к 15-ым суткам культивирования до $3,2 \pm 0,1\%$. Наибольшее значение ИПМЯ эпителиоцитов определяется в *период пролиферации и дифференцировки* на 11-е сутки культивирования (табл. 2).

На протяжении 13 суток культивирования в клетках эпителиальных трубок и выводных протоков поджелудочной железы обнаруживаются митозы. Митотический индекс (МИ) через 9 суток культивирования составляет $1,9 \pm 0,4\text{‰}$; наибольшее его значение также отмечается

через 11 суток культивирования — $3,3 \pm 0,7\%$ (табл. 2). Через 15 суток культивирования митозы в эпителиоцитах трубок и выводных протоков не обнаруживаются. На протяжении всего периода пролиферации и дифференцировки активно включают радиоактивный тимидин и делятся фибробласты стромы.

Через 12 суток культивирования местами на периферии эксплантатов можно видеть первые признаки перестройки эпителиальных трубок в ацинусы, то есть начало вторичной дифференцировки секреторного экзокринного эпителия. В цитоплазме эпителиоцитов трубок увеличивается количество органоидов. Клетки приобретают полярное строение. В базальной части таких клеток появляются канальцы шероховатой эндоплазматической сети, увеличивается количество свободных и связанных рибосом. Появляются большие вакуоли комплекса Гольджи. Ядра клеток имеют обычное строение, содержат одно или два крупных ядрышка. В апикальной части клеток образуются одиночные гранулы прозимогена. Вторичная дифференцировка происходит вначале лишь в отдельных клетках, входящих в состав эпителиальных трубок. Через 13 суток культивирования в апикальных частях цитоплазмы отдельных эпителиоцитов выявляются гранулы зимогена. К этому времени большая часть эпителиоцитов трубок претерпевает секреторную дифференцировку и находится на различных стадиях этого процесса, который в конечном итоге приводит к образованию секреторных структур — ацинусов.

Вблизи эпителиальных трубок через 12 суток культивирования отмечаются скопления эндокринных клеток. Цитоплазма В-клеток характеризуется хорошо развитой шероховатой эндоплазматической сетью. Она образована короткими канальцами и небольшими вакуолями. 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. Тесный контакт гранул с плазмалеммой свидетельствует об активном выведении секрета. Отмечается появление В-клеток в составе эпителиальных трубок. В некоторых В-клетках встречаются митозы.

Через 15 суток культивирования в клетках вторично дифференцированных ацинусов появляются признаки дистрофических и некротических изменений (вакуолизация цитоплазмы, пикноз ядер). А через 17 суток в эксплантатах появляются одиночные периферические

некрозы, что указывает на начало *периода дегенерации*. В участках некроза в большом количестве встречаются лейкоциты, лимфоциты, макрофаги. Цитоплазма последних часто имеет «пенистый» вид, что говорит о высокой активности фагоцитоза. Менее подвержены дистрофическим изменениям малодифференцированные клетки эпителиальных трубок и выводных протоков. В их цитоплазме наблюдается незначительное расширение канальцев шероховатой эндоплазматической сети, набухание митохондрий. Большинство эпителиоцитов содержит умеренное количество элементов эндоплазматической сети, рибосом и митохондрий.

На периферии эксплантатов через 15 суток культивирования отмечается интенсивное разрастание эндокринной паренхимы. Наблюдается слияние отдельных островков в большие массы эндокринной ткани. В цитоплазме В-клеток выявляются многочисленные секреторные гранулы на разных стадиях формирования, накопления и выведения секрета. Встречаются также клетки, одновременно содержащие в цитоплазме гранулы зимогена и эндокринные секреторные гранулы, что указывает на процесс ацино-инсулярной трансформации. Можно предположить, что ацино-инсулярная трансформация эпителиоцитов является одним из источников образования инсулоцитов в органных культурах поджелудочной железы.

Через 30 суток культивирования эпителий сохраняется только по самому краю эксплантатов. Он представлен одиночными эпителиальными трубками, находящимися в стадии дегенерации, и отдельными эпителиальными клетками с большим светлым ядром и просветленной цитоплазмой. Основная часть эксплантатов представлена клеточным детритом, макрофагами и стромой, богатой фибробластическими элементами.

Выводы

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. Эпителиальные трубки образуются в органных культурах эмбриональной поджелудочной железы также за счет пролиферации эпителия выводных протоков.

Эпителиоциты выводных протоков и эпителиальных трубок активно делятся и претерпевают процесс вторичной секреторной дифференцировки, результатом которой является образование концевых отделов - ацинусов. В эпителиоцитах вторично дифференцированных ацинусов отмечается образование гранул зимогена, содержащих панкреатические ферменты.

Из инсулоцитов функционально активными во все сроки исследования остаются В-клетки. В них наблюдаются активные процессы гормонообразования и выведения секрета.

Можно считать, что образование инсулоцитов в органных культурах эмбриональной поджелудочной железы крысы происходит в результате следующих процессов: 1) дифференцировки отдельных эпителиоцитов в составе эпителиальных трубок; 2) пролиферации эндокринных клеток; 3) ацино-инсулярной трансформации эпителия.

Список литературы

1. **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, 37, 5: 499-503.
2. **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, 7, 1: 39-42.
3. **Mandel T.E., Carter W.M., Kaelmunda M.** Organ culture of human fetal pancreas for transplantation. *Transplant. Proc.* 1984, 16, 4: 1040-1042
4. **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, 10, 10: 1452-1456.
5. **Лурья Е.А.** Кроветворная и лимфоидная ткань в культурах. М.: Медицина, 1972, 176 с.
6. **Bals R., Gamarra F., Kaps A., Grundler S., Huber R.M., Welsch U.** Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system. *Cell and Tissue Res.* 1998, 293, 3: 573-577.
7. **Луговой С.В., Бондаренко Т.П., Губина Н.Ф., Олефиренко А.И., Олефиренко А.А.** Органная культура щитовидной железы новорожденных поросят как объект криоконсервирования. *Пробл. криобиол.*, 2003, 2: 98-103.
8. **Чалисова Н.И., Хавинсон В.Х., Давыденко В.В., Доровский А.А., Вербовая Т.А., Пенниайнен В.А.** Влияние цитомединов на развитие органотипической культуры различных тканей внутренних органов крысы. *Цитология*, 2000, 42, 12: 1144-1147.
9. **Лопатина Е.В., Пенниайнен В.А., Зайка А.А.** Исследование участия Na/K-АТФазы в регуляции роста эксплантатов ткани сердца в органотипической культуре. *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 2005, 140, 8: 150-152.
10. **Takahashi Ikuko, Sashima Susumu, Nakazawa Kiyoshi.** Homparative analysis of proteoglycans synthesized by chick corneal stromal cells in cell culture and organ culture. *Biol. and Pharm. Bull.* 2001, 24, 1: 27-33.
11. **Чалисова Н.И., Пенниайнен В.А., Харитонов Н.В., Ноздрачев А.Д.** Динамика стимулирующих и ингибирующих эффектов в органотипической культуре нервной и лимфоидной ткани. *Докл. РАН.* 2001, 380, 3: 418-421.
12. **Чалисова Н.И., Пенниайнен В.А.** Модулирующее действие аминокислот на развитие тканей в органотипической культуре. *Рос. физиол. журнал.* 2004, 90, 6: 801-810.
13. **Stoll Stefan W., Kansra Sanjay, Elder James T.** Metalloproteinases stimulate ErbB-dependent ERK signaling in human skin organ culture. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 30: 26839-26845.
14. **Катинас Г.С., Булгак В.И., Никифорова Е.Н., Светикова К.М.** О нахождении стандартной ошибки средней с учетом индивидуальной изменчивости признака в пределах организма. *Арх. анат., гистол., эмбриол.* 1969, 57, 9: 97-104.