

Stanisława Stokłosowa\*

## Przydatność metody hodowli tkanek w badaniach endokrynologicznych

### Streszczenie

W artykule przedstawiono właściwości i zachowanie się komórek endokrynych w hodowli tkankowej. Na przykładzie jajnika, tarczycy, przysadki i wysepek Langerhansa trzustki zwrócono uwagę na przydatność modelu izolowanych komórek gruczołów dokrewnych w badaniu m.in. miejsca syntezy różnych hormonów w gruczole, interakcji różnych typów komórek w tej syntezie oraz regulacji hormonalnej funkcji gruczołów dokrewnych.

Omówiono także zastosowanie niektórych linii komórek endokrynych do produkcji hormonów w hodowli tkanek. Wspomniano też o modnych obecnie hodowlach komórek w pożywkach bez surowicy i ich znaczeniu dla niektórych badań naukowych.

Technika hodowli tkanek zróżnicowanych nie należy do łatwych, zwłaszcza jeżeli mamy do czynienia z komórkami nie proliferującymi *in vitro*. Komórki endokryne są komórkami wysoce zróżnicowanymi i wyspecjalizowanymi w wytwarzaniu swoistych produktów. Z jednej strony zatem są trudne do hodowania z racji wyspecjalizowania, z drugiej strony, dzięki wydzielaniu swoistych substancji, łatwo jest je identyfikować oraz badać ich funkcje. Dzięki postępowi w rozwoju ilościowych technik oznaczania hormonów, takich jak: metody radioimmunologiczne, radioreceptorowe czy immunoenzymatyczne można oznaczać produkty komórkowe w małych próbkach pożywek

\* Zakład Fizjologii Zwierząt UJ, Pracownia Endokrynologii Zwierząt i Hodowli Tkanek,  
Instytut Zoologii UJ, 30-060 Kraków, ul. Karasia 6

lub w komórkach czy fragmentach tkanek (Szołtys, 1981; S. Stokłosowa et al., 1981).

Pierwsze próby utrzymywania fragmentów żywych gruczołów dokrewnych poza ustrojem w odpowiednich pożywkach podejmowano w celu badania zdolności ich przeżycia, różnicowania się (Gaillard, 1965; Prop, 1973; Wolff, 1965; Lasnitzky, 1965) oraz wzajemnego wpływu np. fragmentów przysadki mózgowej lub szyszynki na różnicowanie się jąder samców (Moszkowska, 1956), względnie wpływu różnych hormonów na explanty nabłonka pochwy (Koziorowska, 1961). Przegląd ważniejszych technik hodowli narządów lub fragmentów tkanek endokrynnych znajduje się w artykule S. Stokłosowej (1979, 1982).

Wprowadzanie hodowli metodą monolayers, w której komórki uzyskane przez rozproszenie tkanki rosną na podłożu szklanym lub plastikowym tworząc cieniutką warstwę, poszerzyło znacznie możliwości badawcze.

Zainteresowanie hodowlą komórek i tkanek pochodzących z gruczołów dokrewnych datuje się od około 30 lat równoległe z burzliwym rozwojem endokrynologii wiążącym się z opracowaniem i wprowadzeniem wspomnianych już metod radioimmunologicznych oznaczania hormonów. Metody te ułatwiły oznaczenie nano-, a nawet pikogramowych ilości hormonów bezpośrednio w pożywkach, w których hodowano odpowiednie komórki endokrynnie. Komórki takich gruczołów jak np.: tarczyca (Hilfer 1973), przysadka mózgowa (Kahn 1973), (Cuttler et al., 1986), jajniki (Channing 1969), jądra (Bilińska 1977), wysepki Langerhansa trzustki (Ziegler, 1975; Moskalewski, 1977) itp. okazały się wdzięcznym materiałem dla hodowli tkankowej lub komórkowej.

Gruczoły dokrewne, nawet najprostsze, mają budowę histologiczną złożoną z co najmniej dwu typów komórek. Najczęściej są to komórki wydzielnicze, tkanka łączna, a także mięśnie gładkie tworzące rodzaj rusztowania i środowiska. Innym, bardziej skomplikowanym przykładem jest przysadka mózgowa lub wysepki Langerhansa trzustki, których komórki

wytwarzają różne hormony. W badaniach endokrynologicznych metodą hodowli tkanek dąży się do wyizolowania ze złożonego strukturalnie gruczołu jednego typu komórek wydzielniczych a następnie hodowanie ich oddzielnie lub w tak zwanej kokulturze z innym wyizolowanym typem komórek. Takie hodowle umożliwiają badanie funkcji jednego typu komórek w złożonym gruczole dokrewnym oraz badanie interakcji dwu lub więcej typów komórek w kokulturach.

Jeden typ komórek można uzyskać mechanicznie lub stosując trawienie różnymi enzymami, jak: trypsyna, kolagenaza, pronaza (Stokłosowa 1982). Gospodarowicz (1975, 1977) stosuje całe zestawy enzymów dla uzyskania odpowiedniej zawiesiny. Wybór enzymu i jego stężenie zależy od rodzaju tkanki poddawanej rozproszeniu. Wartość modelu hodowli izolowanych typów komórek jest niezaprzeczalna. Szereg złożonych procesów zachodzących w niejednorodnych strukturalnie i czynnościowo gruczolach dokrewnych, stanowiących układ bardzo nieprzejrzysty, trudno byłoby prześledzić i rozstrzygnąć. Model izolowanych typów komórek pozwala badać poszczególne etapy procesu, udział poszczególnych typów komórek w tym procesie, sekwencję poszczególnych etapów itp. Przykładem może być znalezienie miejsca syntezy żeńskich hormonów płciowych, estrogenów w pęcherzyku jajnikowym świni. Badania te przeprowadzono na modelu izolowanych komórek warstwy ziarnistej i osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego świni w hodowli tkankowej (Stokłosowa et al., 1982). Hodowle izolowanych wysepek Langerhansa trzustki dostarczyły wielu danych dotyczących metabolizmu wysepek i mechanizmu wydzielania insuliny (Anderson i Hallestrom 1977).

Model taki pozwala także badać procesy regulacji funkcji hormonalnej jednego gruczołu przez inny gruczoł. Odbywa się to albo przez dodawanie hormonu gruczołu tropowego do pożywki w której rosną komórki gruczołu docelowego, albo przez hodowle łączące dwa typy komórek (tzn. kokultury komórek regulujących i komórek regulowanych). Przykładem może być kokultura komórek jajnikowych z komórkami przysadki mózgowej.

Większość komórek endokrynych przejawia w hodowli nabłonkowy epitelialny typ wzrostu (figury: 1,2,5,6). Zawierają one także w cytoplazmie liczne ziarnistości lub krople lipidowe, w które obfitują zwłaszcza komórki produkujące hormony sterydowe, takie jak np. komórki jajnikowe, komórki interstycjalne jądra, lub komórki kory nadnerczy. Dzięki temu takie komórki łatwo odróżnić od fibroblastów i innych komórek podścieliska jeszcze przed założeniem hodowli. Interesująco wygląda powierzchnia komórek endokrynych obserwowana w mikroskopie scanningowym (fig. 7). Liczne pęcherzyki (tzw. blebs) świadczą o czynności wydzielniczej komórki.

W balaniach hormonalnych najczęściej stosuje się tzw. hodowle pierwotne, czyli hodowle wyprowadzone bezpośrednio z tkanki badanego gruczołu. Hodowle takie mają dużą wartość naukową, bowiem komórki endokryne zachowują się przez co najmniej 24 do 48 godzin *in vitro* tak samo jak *in vivo* (Szołtyś et al. 1982). Mamy zatem do czynienia z modelem doświadczalnym porównywalnym z sytuacją *in vivo*, a więc z modelem, którego nie może spotkać zarzut dostarczania nieprawdziwych wyników.

Zawiesina przygotowywana do hodowli powinna zawierać dostateczną ilość komórek wydzielniczych umożliwiających wykrycie ich wydzielin dostępnymi współcześnie metodami (Bilińska i S. Stokłosowa 1977, S. Stokłosowa 1982, Gregoraszcuk, 1983). Nie powinna natomiast być zanieczyszczona fibroblastami, które mogą hodowle przerosnąć i zniszczyć. Segregacji komórek dokonuje się wykorzystując różnicę ich wielkości lub różnicę szybkości przylegania do podłoża. Można też komórki sortować przez wirowanie w różnych gradientach gęstości sacharozy, Ficollu, Percollu itp. bądź też umieszczać hodowle w pożywkach pozbawionych cysteiny, której brak hamuje wybiórczo proliferację fibroblastów. Z własnej praktyki wiadomo, że hodowle komórek gonadalnych, wydzielające duże ilości hormonów sterydowych, nigdy nie przerastają fibroblastami. Widocznie sterydy w znacznym stężeniu są czynni-

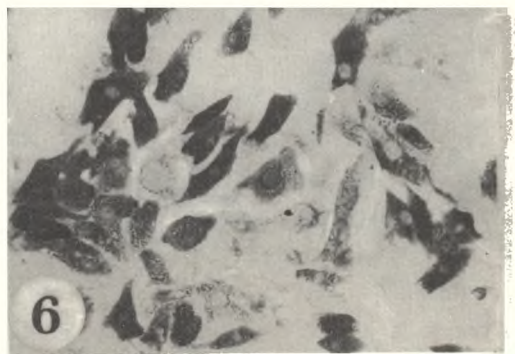
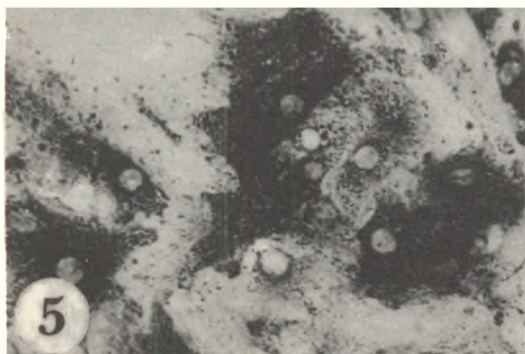
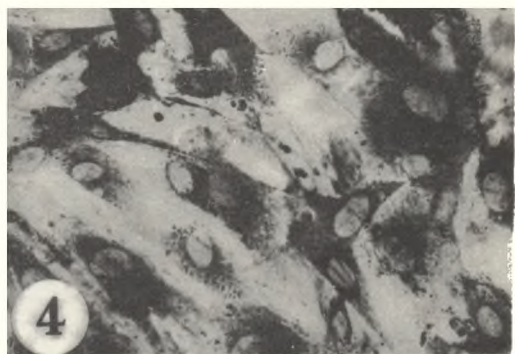
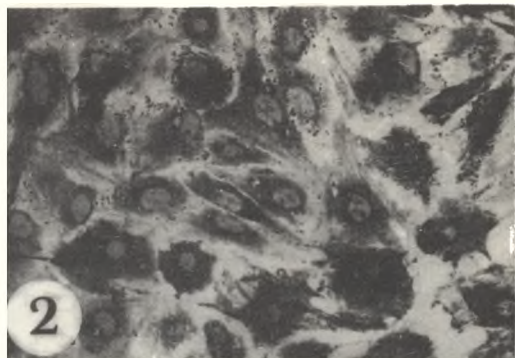
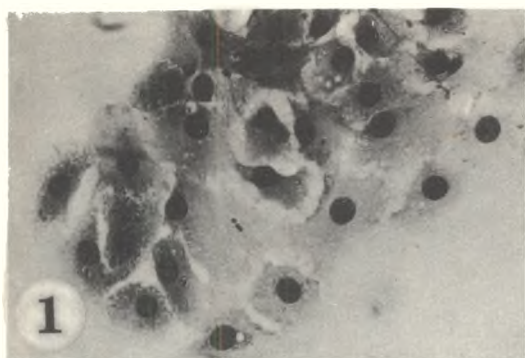


Fig. 1 - 6

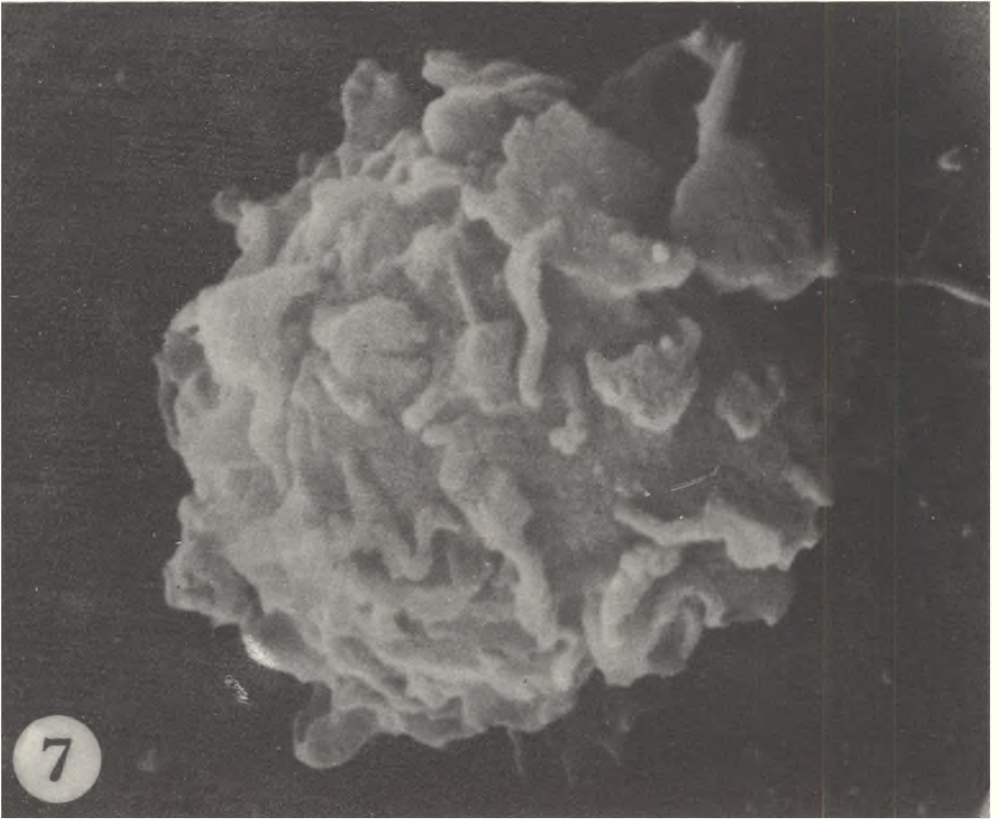


Fig. 7

- Fig. 1. Kolonia komórek warstwy ziarnistej (granulozy) pęcherzyka jajnikowego szczura po 4 dniach hodowli. Barwione Giemszą.
- Fig. 2. Monolayer komórek warstwy ziarnistej z pęcherzyka jajnikowego świni po 8 dniach hodowli. Komórki barwione na aktywność dehydrogenazy  $\Delta^{5,3}$  beta hydroxy sterydowej. (Fischer T.V., Kahn R.H. In Vitro 7, 201-205 (1972)).
- Fig. 3. Komórki osłonki wewnętrznej (theca interna) pęcherzyka jajnikowego świni hodowane przez 4 dni. Barwione Giemszą.
- Fig. 4. Komórki osłonki wewnętrznej pęcherzyka jajnikowego krowy hodowane przez 9 dni. Barwione histochemicznie na aktywność dehydrogenazy sterydowej (jak w fig. 2).
- Fig. 5. Komórki ciała żółtego świni hodowane przez 4 dni. Barwione histochemicznie na aktywność dehydrogenazy sterydowej (jak w fig. 2). Fot.: E. Gregoraszczuk.
- Fig. 6. Komórki Leydiga jądra myszy po 4 dniach hodowli. Barwione histochemicznie na aktywność dehydrogenazy sterydowej. Fot.: B. Bilińska.
- Fig. 7. Powierzchnia komórki ciała żółtego widziana w mikroskopie scanningowym. Pow. x 15000. Fot. E. Krzysztofowicz

$1 \times 10^3$  NG PROGESTERONU / HODOWLE

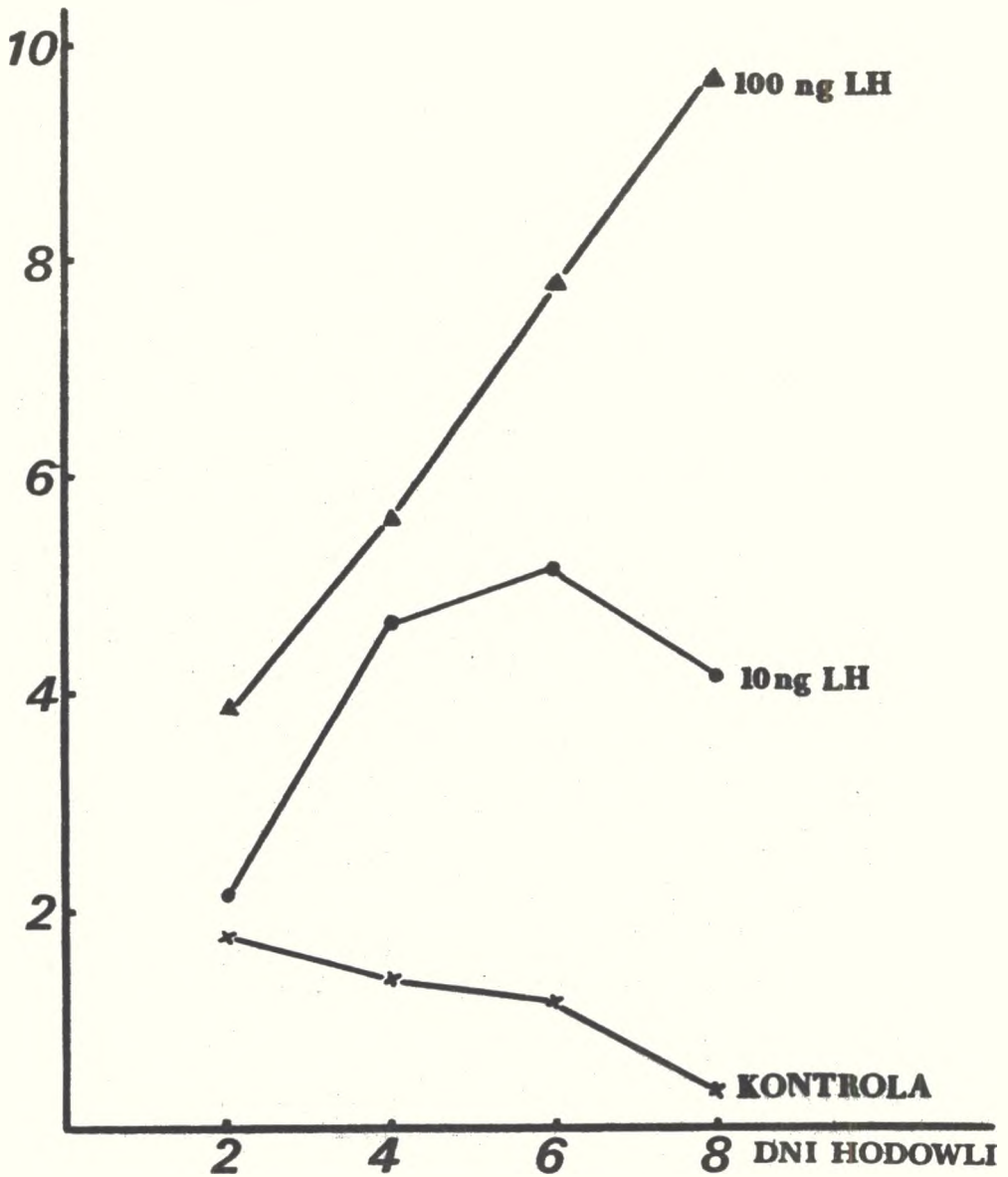


Fig. 8. Wydzielanie progesteronu przez hodowane komórki warstwy ziarnistej świnii.  
x-x - hodowla kontrolna w Medium 199 z dodatkiem 10% surowicy cielęcej,  
•-•- hodowla w pożywce (jak wyżej) z dodatkiem 10 ng LH, lub  
▲-▲- 100 ng LH



kiem hamującym ich proliferację. Fakt ten należałoby udokumentować odnośnym eksperymentem.

Komórki endokrynne rosną w hodowlach pierwotnych bardzo dobrze, tworzą, z różną szybkością, jednowarstwowy film na dnie naczynia hodowlanego. Nie wymagają nadzwyczaj złożonych pożywek. Najczęściej hoduje się je w jednym z rutynowo używanych płynów hodowlanych o określonym składzie chemicznym, jak np. pożywka Parkera, zwana Medium 199 lub pożywka Eagle'a. Pożywki te wzbogaca się najczęściej dodatkiem składnika naturalnego, jak np. surowica cielęca o różnym stężeniu w zależności od wymagań eksperymentu.

Figury 1-6 przedstawiają cztery rodzaje komórek gonadalnych hodowanych metodą monolayers. Komórki takie wydzielają w hodowli pierwotnej swoiste hormony przez 3 do 8 dni. Po tym czasie obserwujemy spadek czynności wydzielniczej. Można je stymulować do lepszego wzrostu oraz wzmożonej lub przedłużonej produkcji hormonalnej dodając do pożywki odpowiedni hormon trępowy. Figura 8 przedstawia zachowanie się trzech hodowli pierwotnych komórek warstwy ziarnistej pęchersyka jajnikowego w pożywce bez hormonu luteinizującego (LH) lub w pożywkach z dodatkiem 10 lub 100 ng tego hormonu na ml pożywki. Miarą działania LH na komórki w hodowli była ilość wydzielonego przez nie progesteronu. Cechą charakterystyczną komórek sterydogennych jest obecność w ich cytoplazmie enzymu dehydrogenazy  $\Delta^5,3$  beta hydroksy steroidowej, której aktywność można wykazać metodami histochemicznymi (figury 2,4,5,6).

Hodowle komórek przysadki mózgowej są doskonałym materiałem do badania regulacji syntezy hormonów przysadkowych przez hormony uwalniające podwzgórza naturalne i syntetyczne a także do badania działania różnego rodzaju antagonistów na ich funkcje (Glenn, 1986). Ponadto komórki przysadki zmienione nowotworowo są źródłem dużych ilości hormonów, które mogą być odzyskiwane z pożywek. Zagadnienie to będzie bardziej szczegółowo omówione w dalszej części tego artykułu.

Wiele gruczołów dokrewnych funkcjonuje cyklicznie, jak np. podwzgórze, przysadka, gonady samic, lub tylko w pewnych okresach doby, sezonu, czy życia, np. kora nadnerczy, grasicca, szyszynka, gonady, łożysko czy gruczoł mlekowy. Fakt ten należy wziąć pod uwagę z wielką odpowiedzialnością aby wyniki hodowli przedstawiały dane pewne i fizjologiczne. Wiek i dojrzałość płciowa dawcy tkanek musi być również uwzględniona, bowiem niektóre gruczoły u osobników niedojrzałych funkcjonują inaczej, a przede wszystkim na innym poziomie, niż u osobników dojrzałych lub starzejących się.

Zatem pobierając materiał endokrynnny do hodowli tkanek należy zwracać uwagę na wiek zwierzęcia, na fazę cyklu płciowego czy sezonowego, oraz należy pamiętać o tzw. life span czyli okresie aktywności hormonalnej danego gruczołu bądź jakiejś jego integralnej części. Jest to szczególnie ważne w odniesieniu do takich składników gruczołu jak np. przedowulacyjny pęcherzyk jajnika, ciało żółte, komórki przysadki cyklującej samicy wydzielające gonadotropiny itp.

#### HODOWLE KOMÓREK ENDOKRYNNYCH JAKO ŹRÓDŁO HORMONÓW

Istnieje szereg linii komórkowych, które wydzielają w hodowli duże ilości hormonów (Tashijan 1977). W odpowiednich warunkach taka "ferma" komórkowa produkuje hormony nie tylko na skalę laboratoryjną lecz nawet handlową. Przykładem jest produkcja szczurzej prolaktyny i hormonu wzrostu oraz mysiej kortykotropiny (ACTH). Ilość hormonów uzyskiwanych w hodowli dochodzi do 200 mikrogramów na miligram białka na 24 godziny. Nowe linie komórek produkujących hormony można wyprowadzić na drodze transformacji wirusowej lub chemicznej normalnych komórek endokrynnnych w hodowli pierwotnej. Linie produkującą hormon można uzyskać także przez hybrydyzację komórek wydzielających dany hormon o ograniczonym potencjale wzrostowym z linią ciągłą o nieograniczonym potencjale pro-

liferacyjnym. Rezultatem takiej hybrydyzacji jest nieśmier-  
telna linia komórkowa szybko rosnąca, produkująca dany hor-  
mon w sposób ciągły.

Roswijająca się biotechnologia umożliwia wszczepianie  
genu odpowiedzialnego za syntezę danego hormonu w komórce  
endokrynej do komórki linii ciągłej szybko proliferującej.  
Poszerzy to na pewno wachlarz "ferm" komórkowych wytwarzają-  
cych hormony na zamówienie. Oprócz wymienionych wyżej linii  
komórkowych wyhodowano szczepy komórkowe produkujące nano-  
gramowe do mikrogramowych ilości mysiej tyreotropiny i uwal-  
niającego ją hormonu podwzgórzowego (TRH), gonadotropiny  
kosmówkowej oraz somatotropiny żółtych.

Istnieją również szczepy komórkowe wywodzące się z nowo-  
tworów przysadki mózgowej, które produkują duże ilości pro-  
laktyny i hormonu wzrostu, lub szczepy wywodzące się z no-  
wotworu kosmówki żółtych produkujące duże ilości gonadotro-  
piny kosmówkowej. Niektóre z tych linii żyją w hodowlach  
ciągłych, ustawicznie pasażowane, już ponad dziesięć lat bez  
utruty swoistej funkcji i bez objawów starzenia się. Komór-  
ki takie podwajają swą ilość co dwa dni i produkują hormony,  
które pod względem biologicznym i immunologicznym nie róż-  
nią się od hormonu naturalnego wydzielanego przez odpowiedni  
gruczoł in vivo. Komórki ciągłej linii hormonalnej przysad-  
ki reagują też swoiście na hormony działające na przysadkę  
in vivo, jak np. TRH, estradiol i tyroksyna (Tashijan 1977,  
Knażek 1977).

#### HODOWLE KOMÓRKOWE W POŻYWKACH BEZ SUROWICY

Do hodowli większości komórek endokrynych w pożywkach  
wzbogaconych dodatkiem surowicy wystarcza dobre podłoże o  
określonym składzie chemicznym, zawierające niezbędne amino-  
kwasy i witaminy. Wg Sato i wsp. (1977) surowica, jako skład-  
nik pożywki w rutynowo używanym stężeniu 10%, nie jest wy-

starczającym źródłem hormonów, podtrzymującym wzrost komórek endokrynych w hodowli. Ponadto surowica zawiera inhibitory uniemożliwiające rozwój pełnej aktywności niektórych hormonów. Dlatego komórki hodowane w pożywce zawierającej surowicę szybko starzeją się lub odróżnicowują i przestają wydzielać swoiste hormony.

Również badania biochemiczne procesów zachodzących w hodowanych komórkach endokrynych wymagają pożywek o składzie jak najdokładniej określonym chemicznie. Jest to dalszy argument za eliminowaniem surowicy jako składnika pożywki o składzie nieokreślonym.

Zastąpienie surowicy samą pożywką o określonym składzie chemicznym daje bardzo mizerne efekty hodowlane. Komórki bardzo słabo rosną i przeżywają w hodowli przez krótki okres. Konieczność znalezienia odpowiednich składników, które zastąpiłyby surowicę była bodźcem dla podjęcia różnych badań w celu wynalezienia pożywek dla szeregu tkanek endokrynych, takich jak komórki kory nadnerczy (Simonian et al. 1984), jądra jajnika (Orly 1984), gruczołu mlekowego (Stampfer 1984) i szeregu linii komórkowych wyprowadzonych z różnego rodzaju nowotworów gruczołów dokrewnych. I tak np. dla komórek kory nadnerczy pożywka bez surowicy powinna zawierać fibronektynę, ułatwiającą przyczepianie się komórek do podłoża, czynniki wzrostu: epitelialny i fibroblastyczny, insulinę, transferynę, albuminę bydlęcą oczyszczoną z wolnych kwasów tłuszczowych, selen, witaminy E i C. Barnes i Sato (1980) zaproponowali pożywkę, która może być użyta także w hodowli komórek jajnikowych. Jej głównymi składnikami oprócz pożywki o określonym składzie chemicznym są zamiast surowicy- fibronektyna, transferyna, insulina i hydrokortizon. W pożywkach takich, wg wymienionych wyżej autorów, komórki rozwijają pełnię możliwości wydzielniczych oraz reagują na czynniki tropowe (ACTH lub FSH) w sposób niczym niezahamowany. Jest to jeden z argumentów przemawiających za użyciem pożywek bez surowicy. Zaznaczyć jednak trzeba, iż

tego typu pożywki są znacznie droższe, gdyż wymagają wielu składników, które albo trzeba samemu przygotować (np. transferyna), albo kupić.

Szereg badań dotyczących sekrecji i stymulacji tego procesu czy interakcji różnych typów komórek hodowanych we wspólnych naczyniach można jednak w dalszym ciągu prowadzić w pożywkach uzupełnionych surowicą, z tym że eksperymentalnie trzeba znaleźć najniższe jej stężenie, które będzie podtrzymywało zadowalający wzrost komórek bez istotnej interferencji z ich funkcją. Tę zależność udało nam się zaobserwować w hodowlach komórek jajnikowych prowadzonych w Pracowni Hodowli Tkanek przy Zakładzie Fizjologii Zwierząt UJ, która powstała z przyzwolenia i poparcia byłego Kierownika tego Zakładu Prof. dra Adama Kulczyckiego.

Hodowle tkanek endokrynnych znalazły również szerokie zastosowanie w fizjologii rozrodu i przyczyniły się do rozstrzygnięcia szeregu problemów związanych z regulacją hormonalną funkcji jajników i gonad, miejscem syntezy hormonów w jajnikach, jądrze oraz w komórkach przysadki.

Są również dobrym modelem doświadczalnym w badaniach:

- 1) biosyntezy hormonów białkowych,
- 2) procesów wydzielania i uwalniania hormonu z komórki,
- 3) mechanizmu działania hormonów na komórkę docelową,

oraz

- 4) przetwarzania hormonów przez komórkę docelową.

Nie wspominam tu o badaniach dotyczących zaburzeń funkcji hormonalnych, w których hodowle tkanek endokrynnych są bardzo ważnym warsztatem pomocniczym.

## LITERATURA

1. Andersson A., Hellerström C., 1977, Isolated pancreatic islets in tissue culture: An investigative tool for studies of islet metabolism and hormone production. In Pan-

- creatic beta cell culture. Eds: E. von Wasilewski, W.L. Chick, Excerpta Medica Amsterdam-Oxford, pp. 55-64.
2. Barnes D., Sato G., 1980, Methods for growth of cultured cells in serum-free medium. Anal. Biochem., 102, 255-270.
  3. Bilińska B., 1979, Histochemical demonstration of  $\Delta^5,3$  - beta-hydroxy-steroid dehydrogenase activity in cultured Leydig cells under the influence of gonadotropic hormones and testosterone. Int. J. Androl., 2, 385-394.
  4. Channing C.P., 1970, Influence of the in vivo and in vitro hormonal environment upon luteinization of granulosa cells in tissue culture. Recent Prog. Horm. Res. 26, 589-622.
  5. Cuttler L., Welsh J.B., Szabo M., 1986. The effect of age on somatostatin suppression of basal growth hormone (GH) - releasing factor - stimulated, and dibutyryl adenosine 3, 5'-monophosphate - stimulated GH release from rat pituitary cells in monolayer culture. Endocrinology, 119, 152-158.
  6. Gaillard P.J., Schaberg A., 1965, Endocrine Glands, In Willmer, E. N. (ed.) Cells and Tissues in Culture. Methods, Biology and Physiology. Vol. 2, Academic Press, London, New York, pp. 631-695.
  7. Glenn K.C., 1986, Regulation of release of somatotropin from in vitro cultures of bovine and porcine pituitary cells. Endocrinology, 118, 2450-2457.
  8. Gospodarowicz D., Gospodarowicz F., 1975, The morphological transformation and inhibition of growth of bovine luteal cells in tissue culture induced by luteinizing hormone and dibutyryl c-AMP. Endocrinology, 96, 458-467.
  9. Gospodarowicz D., Ill. Ch. R., Mescher A.L., Moran J.S., 1977, The control of proliferation of steroid producing cells and endothelial cells by the fibroblast growth factor and the epidermal growth factor. In: James V.H.T. (ed.). Endocrinology (Proc. V<sup>th</sup> Int. Congr. Endocr., Hamburg, Vol. 2, Excerpta Medica, Amsterdam, pp. 261-265.

10. Gregoraszczyk E., 1983, Steroid hormone release in cultures of pig corpus luteum and granulosa cells: Effect of LH, HCG, PRL and estradiol. *Endocrinologia Experimentalis*, 17, 59-68.
11. Hilfex S.R., 1973, Collagenase treatment of chick heart and thyroid. In: *Tissue Culture, Methods and Applications*, Kruse, P.F. jr., Patterson, M.K. jr. (eds). Academic Press, New York, San Francisco, London, pp. 16-20.
12. Kahn R.H., Rat Pituitariness Explants., In: *ibidem* pp. 114-119.
13. Knazek R.A., 1977, Endocrine cell culture on artificial capillaries, In: *Pancreatic beta cell culture*. E. von Wasielewski and W.L. Chick (eds). *Excerpta Medica*, Amsterdam-Oxford, pp. 29-33.
14. Koziorowska J., 1961, About the direct effect of estradiol on alkaline phosphatases in vaginal epithelium surviving in vitro on synthetic medium. *Endokryn. Polska*, 12, 19-21.
15. Lasnitzky J., 1965, The Action of Hormones on Cell and Organ Cultures. In: *Cells and Tissues in Culture*. Willmer E.N. (ed.) Academic Press, London, New York, Vol. 1, pp. 591-650.
16. Moskalewski S., 1977, Isolated islets in tissue culture. In: *Pancreatic Beta Cell Culture*. E. von Wasielewski, Chick, W. L. (eds). *Excerpta Medica*, Amsterdam-Oxford, pp. 65-70.
17. Moszkowska 1956, Gonadotropic activity of the chick embryo hypophysis. *Arch. Anat. micr. Morph. exp.* 45, 65-69.
18. Orly J., 1984, Growth of functional primary and established rat ovary cell cultures in serum-free medium. In: *Serum-Free Culture of the Endocrine System*. Barnes D.W., Sirbasku D.A., Sato G.H. (eds), Alan R., Liss Inc. New York, pp. 63-87.

19. Prop F.J.A., Wiepjes G.J., 1973, Sequential enzyme treatment of mouse mammary gland. In: Tissue Culture, Methods and Applications. Krause P.F. jr., Patterson M.K. jr (eds). Academic Press, New York, San Francisco, London, pp. 21-24.
20. Sato G., Hayashi I., Hutchings S., Mather J., 1977, The replacement of serum with hormones and its implications for primary culture. In: Pancreatic Beta Cell Culture. E. von Wasielewski W.L. Chick (eds). Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, pp. 23-27.
21. Simonian M.H., White M.L., 1984, Growth of adrenocortical cell cultures in serum-free medium. In: Methods for Serum-Free Culture of Cells of the Endocrine System. Barnes D.W., Sirbasku D.A., Sato G.H. (eds), Alan R., Liss, Inc., New York, pp. 15-27.
22. Stokłosowa S., 1979, Hodowla narządowa na sztucznych naczyniach oraz wytwarzanie swoistych produktów komórkowych in vitro. Post. Biol. Kom., 6, 115-129.
23. Stokłosowa S., Gregoraszczyk E., Holečkova E., Michl J., 1981, Enhanced multiplication and progesterone production by porcine granulosa cells cultured in serum free medium. Exptl. Cell. Res., 131, 430-435.
24. Stokłosowa S., 1982, Tissue culture of gonadal cells. Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 33, 367-379.
25. Stokłosowa S., Gregoraszczyk E., Channing C.P., 1982, Estrogen and progesterone secretion by isolated cultured porcine thecal and granulosa cells. Biol. Reprod., 26, 943-952.
26. Szołtyś M., 1981, Oestrogens and progesterone in rat ovarian follicles during the oestrous cycle. J. Reprod. Fert., 63, 221-224.
27. Szołtyś M., Stokłosowa S., Kasten F.H., 1982, Secretion of cultured rat ovarian follicles isolated at various hours of proestrus. In Vitro, 18, 463-468.



28. Tashijan A. jr. 1977, Cell cultures as a source of hormones. In: Pancreatic Beta Cell Culture. E. von Wasielewski, Chick W. L. (eds), Excerpta Medica, Amsterdam-Oxford, pp. 5-7.
29. Wolff Et., Haffen K., 1965, Germ Cells and Gonads. In: Willmer E.N. (ed.) Cell and Tissues in Culture., Vol. 2. Academic Press, New York, pp. 297-743.
30. Ziegler B., Ziegler M., Mehling R., 1975, Culture of islets of Langerhans as a tool in diabetes research. *Experientia*, 31, 610-611.

Stanisława Stokłosowa

## USEFULNESS OF TISSUE CULTURE TECHNIQUE IN ENDOCRINOLOGICAL RESEARCH

### Summary

The characteristics and function of endocrine cells in tissue culture have been discussed. The importance of the model of isolated endocrine cell types for research on the sites of hormone synthesis, on interaction of particular cell types as well as on hormonal regulation of their function has been stressed.

The application of several endocrine cell lines to production of hormones in tissue culture system has been described.

At last some information about the serum - free cultures which were developed recently, and their application, was given.

Станислава Стокłosова

## ПРИГОДНОСТЬ МЕТОДА ВЫРАЩИВАНИЯ ТКАНЕЙ В ЭНДОКРИНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

### Резюме

В статье представлены свойства и поведение эндокринных клеток в разведении тканей. На примере яичника детовидной железы, гипофиза и сыпи Лангерханса поджелудочной железы об-

радено внимание на пригодность модели изолированных клеток желез внутренней секреции в исследованиях между другими: места синтеза разных гормонов в железе, интеракции разных типов клеток в этом синтезе, а также регуляции гормональной функции желез внутренней секреции.

Обсуждено также применение некоторых линий эндокринных клеток в продукции гормонов и выращивании тканей. Упоминается о модном в наше время выращивании клеток в питательной среде без сыворотки и их значения для некоторых научных исследований.