

УДК 577.175.44.085.22

С.Б. Билявская, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

ГОРМОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ НОВОРОЖДЕННЫХ ПОРОСЯТ

Исследованы гормонопродукция тироксина, жизнеспособность и морфология клеток первичной культуры щитовидной железы новорожденных поросят на разных сроках культивирования. Показано наличие гормональной активности культуры, активный рост и формирование монослоя из жизнеспособных клеток.

Ключевые слова: тироксин, щитовидная железа, первичная культура, тироцит.

Клетки неонатальной ткани щитовидной железы (ЩЖ) являются удобной моделью изучения эндокринной функции, поскольку обладают высокой пролиферативной активностью, чувствительностью к действию ряда стимуляторов, способностью к органоспецифической дифференцировке. Известно, что ткань ЩЖ состоит из гетерогенной популяции клеток, имеющих разных предшественников. Тироциты, представляющие собой эпителиальные клетки, функция которых заключается в биосинтезе и секреции тироксина, занимают основную массу тиреоидной ткани. Парафолликулярные С-клетки (кальцитонинпродуцирующие клетки) составляют 0,1 % от всех клеток ЩЖ и являются производными клеток нервного гребня. Есть данные, что в неонатальной ткани ЩЖ их в 10 раз больше, чем в зрелой [1]. Оксифильные клетки, или клетки Ашкенази–Гюртле, отличаются от фолликулярного эпителия большей величиной, эозинофильной гранулированной цитоплазмой, данные клетки секретируют биогенные амины, в том числе серотонин [2]. Кроме того, ЩЖ обильно васкуляризирована и имеет большое количество соединительнотканых элементов, что, в свою очередь, обогащает клеточную культуру эндотелиальными клетками и фибробластами. Такая гетерогенность культуры ЩЖ ставит вопрос о необходимости определения фенотипической принадлежности клеток. Поэтому на данном этапе исследования была поставлена задача идентифицировать тиреоидный эпителий в первичной культуре ЩЖ по способности секретировать тироксин.

Трансплантация ткани/клеток ЩЖ может являться методом лечения гипотиреоза. Эффективность данного метода может обуславливаться не только заместительной функцией трансплантата, но и биогенной стимуляцией регенерации собственной ткани ЩЖ. В связи с этим огромное значение имеет получение жизнеспособных гормонально-активных клеточных культур, способных компенсировать недостаток тиреоидных гормонов.

Цель исследования — изучить гормональную активность и морфологические особенности клеток первичной культуры ЩЖ новорожденных поросят.

Материал и методы. Тироциты и фолликулы изолировали из ЩЖ новорожденных поросят путем 3-этапной ферментативной дезагрегации с использованием 1 мкг/мл коллагеназы типа IA и 0,1 мкг/мл ДНКазы (Sigma, USA) при 37 °С с последующим охлаждением и 3-кратной отмывкой раствором, содержащим 0,2 % бычьего сывороточного альбумина. Полученную суспензию, состоящую из 0,5·10⁶ фолликулов и 1·10⁶ клеток с жизнеспособностью 80–90 %, помещали в культуральные флаконы (Stastet, USA) и культивировали на среде 199, обогащенной 10 % фетальной телячьей сывороткой, при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 6 суток. Питательную среду заменяли на 1-е и 4-е сутки культивирования. На 2-е и 6-е сутки отбирали среду культивирования на определение содержания гормонов. Концентрацию тироксина измеряли радиоиммунологическим методом с помощью стандартных тест-наборов РИА-Т4 СТ (Бе-

© С.Б. Билявская, Г.А. Божок, Е.И. Легач, Т.П. Бондаренко, 2011

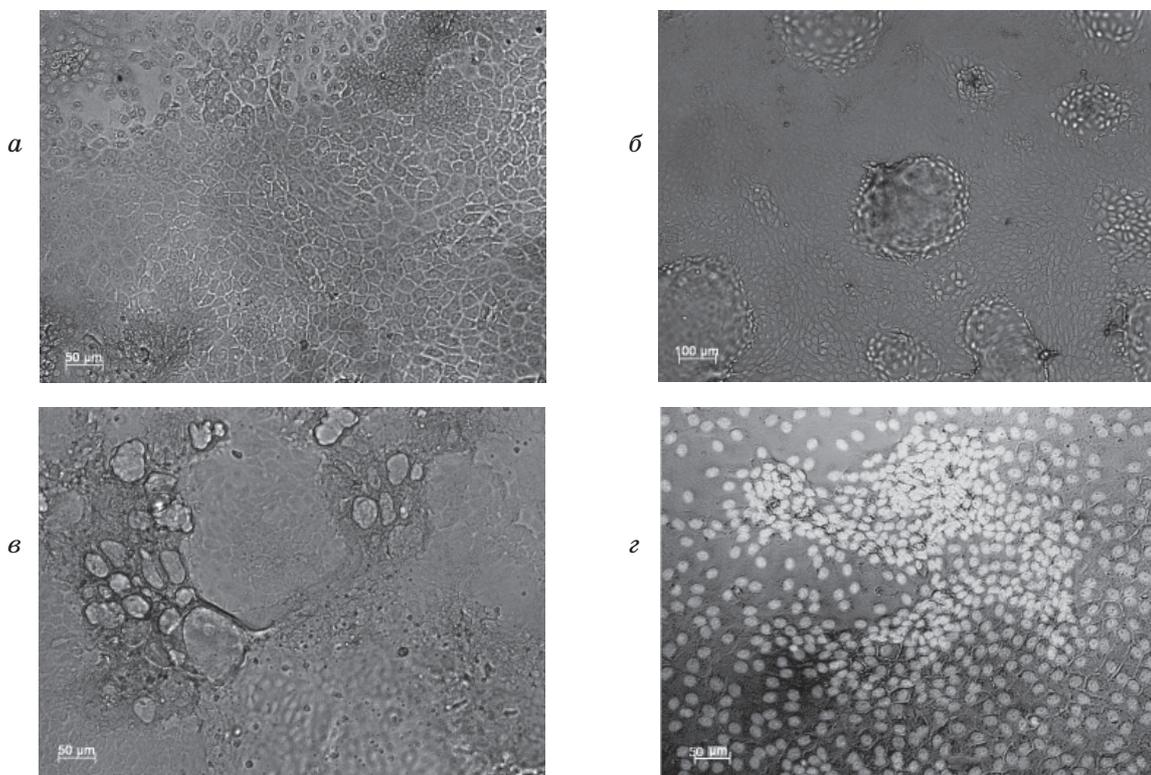
ларусь) согласно инструкции. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева, жизнеспособность определяли методом суправитального окрашивания трипановым синим. В целях визуализации жизнеспособных клеток культуру прижизненно окрашивали флуоресцентным красителем Hoechst 33342 (Sigma, USA) в конечной концентрации 5 мкг/мл и исследовали с помощью конфокального лазерного микроскопа Carl Zeiss Axio Observer Z1 и пакета прикладных программ для обработки изображения. Впоследствии клеточную культуру фиксировали 4 % параформальдегидом, окрашивали гематоксилином и эозином, микроскопировали в фазовом контрасте. Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента для значений с нормальным распределением и однофакторного дисперсионного анализа — для непараметрических данных.

Результаты и их обсуждение. На 2-е сутки концентрации тироксина в среде культивирования первичной культуры ЩЖ новорожденных поросят достигала $(122,49 \pm 0,70)$ нмоль/л, на 6-е сутки содержание гормона снижалось до $(56,75 \pm 1,20)$ нмоль/л. Снижение уровня тироксина в данном случае составляло 53,67 %. В аналогичных ис-

следованиях гормонопродукции тироцитов новорожденных поросят показано снижение уровня тироксина со 2-х по 5-е сутки культивирования на 86,1 % [3]. Гормонопродуцирующий потенциал первичной культуры тироцитов, полученный нами, оказался выше, чем таковой органотипической культуры ЩЖ новорожденных поросят, где уровень тироксина составил $(36,29 \pm 1,70)$ нмоль/мг белка [4]. Кроме того, в исследовании [5] содержание тироксина в среде культивирования на 2-е сутки составляло $(14,28 \pm 0,60)$ нмоль/мг белка, а на 6-е — $(8,31 \pm 0,10)$ нмоль/мг белка, что значительно ниже полученных нами значений.

Полученные нами результаты свидетельствуют о более высокой гормональной активности первичной культуры тироцитов новорожденных поросят, полученной по разработанной нами методике, по сравнению с активностью органотипической культуры. Кроме того, наличие продукции тироксина в первичной культуре ЩЖ новорожденных поросят свидетельствует о принадлежности клеток культуры к фолликулярному эпителию, участвующему в синтезе и секреции гормона.

Микроскопическими исследованиями (рисунок) показано, что на 2-е сутки культи-



Первичная культура клеток ЩЖ новорожденных поросят: *a* — 2-е сутки; *b* — 4-е сутки; *v* — 6-е сутки; *z* — окрашивание флуоресцентным красителем Hoechst 33342

вировання первична культура клеток ЩЖ новорожденных поросят характеризовалась активным ростом (конфлюентность монослоя достигала 60–70 %). Клетки монослоя имели полигональную форму, крупное ядро, содержащее по 2 ядрышка и более, что свидетельствует об отсутствии или о слабой дифференцировке клеток (рисунок, а). В последующие сутки культивирования имело место образование множественных клеточных доменов округлой формы с многослойной структурой (рисунок, б). К 6-м суткам монослой достигал 100 %, наблюдалась частичная дифференцировка клеток, неофолликулогенез: границы доменов уплотнились, при этом наблюдалось образование фолликулоподобных структур (рисунок, в).

При микроскопии культуры, окрашенной флюоресцентным красителем Hoechst 33342 (рисунок, г), визуализировались ядра с интенсивной флюоресценцией, что является относительным показателем жизнеспособности клеток.

Таким образом, полученную жизнеспособную гормонально-активную первичную

культуру клеток ЩЖ можно использовать в дальнейшем для изучения возможности коррекции гормональной недостаточности щитовидной железы путем трансплантации.

Выводы

1. Первичная культура клеток щитовидной железы новорожденных поросят на 6-е сутки культивирования имеет способность к синтезу и секреции тироксина, концентрация которого значительно, выше чем в органотипической культуре щитовидной железы. Наличие тироксина в среде культивирования доказывает принадлежность клеток культуры к фолликулярному эпителию.

2. Первичная культура клеток щитовидной железы новорожденных поросят обогащена жизнеспособными клетками тиреоидного эпителия, обладающими высоким пролиферативным потенциалом, что предполагает возможность длительного поддержания культуры, а также необходимость проведения дальнейших исследований морфологии при многократном пассажировании клеток.

Список литературы

1. Wolf H. J. Distribution of calcitonin containing cells in the normal neonatal human thyroid gland: a correlation of morphology with peptide content / H. J. Wolf, R. A. DeLelis // J. Clin. Endocrinol. Metabol. — 1975. — V. 41. — P. 1076–1081.
2. Тронько Н. Д. Рак щитовидной железы у детей Украины (последствия чернобыльской катастрофы) / Н. Д. Тронько, Т. И. Богданова. — К. : Чернобыльинтеринформ, 1997. — 200 с.
3. Изучение морфофункциональных свойств культивируемых тироцитов новорожденных поросят с целью определения возможности их применения для компенсации гипофункций щитовидной железы / И. Н. Шостак, Н. Д. Тронько, Ю. Н. Зурнаджи [и др.] // Проблемы эндокринологии. — 1992. — Т. 38, № 5. — С. 33–37.
4. Пат. 46440 Україна, № 12N5/00. Спосіб підвищення гормональної активності органотипових культур щитовидних залоз новонароджених поросят з метою їх подальшої трансплантації / Білявська С. Б., Божок Г. А., Легач Є. І. [та ін.] (Україна). — Заявл. 09.06.09 ; опубл. 25.12.09, Бюл. № 24.
5. Луговий С. В. Вплив кріоконсервування на культуру клітин щитовидної залози новонароджених поросят : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук / С. В. Луговий. — Харків, 2003. — 18 с.

С.Б. Білявська, Г.А. Божок, Е.І. Легач, Т.П. Бондаренко

ГОРМОНАЛЬНА АКТИВНІСТЬ І МОРФОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ ПЕРВИННОЇ КУЛЬТУРИ КЛІТИН ЩИТОВИДНОЇ ЗАЛОЗИ НОВОНАРОДЖЕНИХ ПОРОСЯТ

Досліджено гормонопродукцію тироксину, життєздатність і морфологію клітин первинної культури щитовидних залоз новонароджених поросят у різні терміни культивування. Показано наявність гормональної активності культури, активний ріст і формування моношару із життєздатних клітин.

Ключові слова: тироксин, щитовидна залоза, первинна культура, тироцит.

S.B. Bilyavskaya, G.A. Bozhok, E.I. Legach, T.P. Bondarenko

HORMONAL ACTIVITY AND MORPHOLOGICAL PECULIARITY OF PRIMARY CELL CULTURE OF THYROID GLANDS OF NEWBORN SUCKING PIGS

Thyroxin production, cells viability and morphology of primary cell culture of thyroid glands of newborn sucking pigs were investigated on the different time of cultivation. The presence of hormonal activity of culture, strong growth and the formation of a monolayer of viable cells was shown.

Key words: thyroxin, thyroid gland, primary culture, thyroid cell.