

В.А.Горанов, С.И.Третьяк, В.Я.Хрыщанович, Ю.А.Горанова
**Получение культуры тиреоцитов из фетальной щитовидной
железы кроликов *in vitro* для ксенотрансплантации**

Целью настоящего исследования было получение и морфо-функциональное исследование культуры тиреоцитов из фетальной щитовидной железы кролика. Была отработана оптимальная методика получения культуры тиреоцитов, которая в процессе дифференцировки клеточных кластеров проходит стадию монослоя, в дальнейшем организуясь в фолликулоподобные кластеры. Культура сохраняет в общих чертах морфотипические показатели (способна образовывать фолликулы и коллоидное вещество) и функцию: обладает способностью к синтезу гормонов, свойственных этой железе.

Ключевые слова: культура клеток, щитовидная железа, тиреоцит, ксенотрансплантация.

V.A.Goranov, S.I.Tret'yak, V.Ya.Khryshchanovich, Yu.A.Goranova
Preparation of the thyrocyte culture from rabbit fetal thyroid gland *in vitro* for xenotransplantation

The aim of this study was a preparation and morpho-functional study of the thyrocyte culture from rabbit fetal thyroid gland. The optimal method of the thyrocyte culture preparation was designed which are developing through a monolayer cytotypic into organotypic culture ("mini thyroid gland"). Thyroid cellular cultures save its morphological feature and endocrine function: capable to form follicles, colloidal material and synthesize thyroid hormones.

Key words: thyroid culture, thyroid gland, thyrocyte, xenotransplantation.

Заболевания щитовидной железы (ЩЖ) часто сопровождаются нарушением биосинтеза тиреоидных гормонов и требуют заместительной терапии. Наиболее распространенный в настоящее время медикаментозный метод лечения первичного гипотиреоза, предусматривающий прием заместительных тиреоидных препаратов, имеет ряд недостатков и ограничений. Заместительная гормональная терапия требует длительного, в некоторых случаях пожизненного применения, что чревато невозможностью постоянной коррекции метаболизма в соответствии с биологическими потребностями организма в каждый конкретный период времени [4,11]. Опубликованы данные о резистентности организма к синтетическим гормонам ЩЖ и возникновении аллергических реакций при их использовании [1,9].

Оптимальным, наиболее физиологичным вариантом компенсации гормональной недостаточности является трансплантация ЩЖ. Пересадка целого эндокринного органа или его фрагмента практикуется на протяжении нескольких десятилетий, но достаточного развития не получила [3,5]. Основным препятствием является дефицит аллогенного донорского материала, отсутствие надежных способов консервирования ткани, которые позволили бы создать банк типированных по иммунологическим признакам органов, что необходимо для селекции пар донор-реципиент, а также проблемы, связанные с техникой пересадки целого органа. Вышеуказанных недостатков избавлена свободная пересадка ксеногенных тканей

и клеток ЩЖ [8]. Разработка нового способа компенсации гормональной недостаточности путем ксенотрансплантации ткани и клеток ЩЖ связана с необходимостью преодоления барьера гистосовместимости донора и реципиента. Анализ литературных данных выявил, что отторжение трансплантата происходит вследствие поражения его иммунологическими агентами реципиента, активирование которых инициируют лимфоидные клетки донора, которые находятся в пересаживаемой ткани [7,12]. Ослабление иммуногенности ксенотрансплантата можно достигнуть путем удаления “лейкоцитов-пассажира” с помощью предварительного культивирования *in vitro*, что приводит к увеличению сроков его функционирования в организме реципиента [2,10].

С учетом данных литературы и на основании собственного опыта была отработана рациональная методика получения гормонпродуцирующей культуры тиреоцитов (ТЦ) из ЩЖ плодов кроликов [6].

Материалы и методы

Обоснование выбора донорского материала

С 2002 года нами в качестве источника культуры ТЦ стала использоваться ЩЖ плодов и новорожденных кроликов. Возможность широкого разведения кроликов делает этот источник донорских тканей практически неограниченным. Нами был осуществлен детальный морфологический анализ строения ЩЖ плодов, новорожденных и взрослых кроликов. Проведенные исследования выявили своеобразия гистологической структуры кроличьей ЩЖ. Более подходящей (как источник ТЦ) оказалась ЩЖ новорожденных кроликов. В ней примерно так же, как в плодной ЩЖ слабо (по сравнению со ЩЖ взрослого кролика) развита стромальная ткань, но в то же время уже достаточно развита эндокринная (фолликулярная) ткань (Рис.1,2).

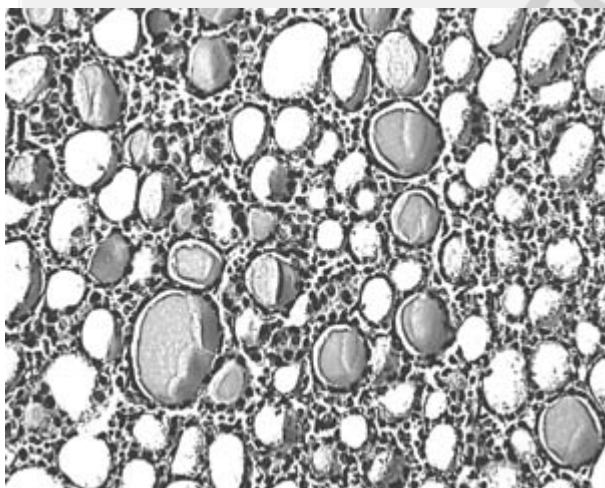


Рис.1. Нормальное гистологическое строение щитовидной железы новорожденного кролика. Микрофото. УВ – 40, ОК – 10. Окраска: гематоксилин-эозин.

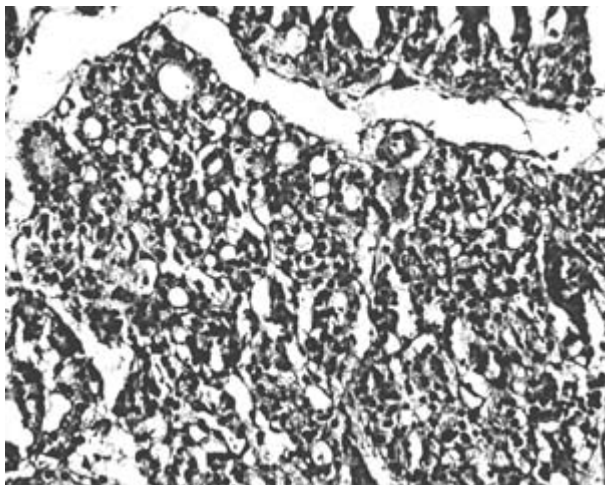


Рис.2. Нормальное гистологическое строение щитовидной железы плода кролика. Микрофото. УВ – 40, ОК – 10. Окраска: гематоксилин-эозин.

Получение исходного материала (забор щитовидных желез)

Извлечение и обработку ЩЖ проводили в специальном боксе. Экстирпацию ЩЖ осуществляли с соблюдением строгих правил асептики и антисептики. Забитое животное тщательно отмывали несколько раз в теплой проточной воде и укладывали на спину. Кожу передней поверхности шеи и грудной клетки просушивали тампоном и дважды обрабатывали 2,5% спиртовым раствором йода. Рассекали и отпрепаровывали изогнутыми ножницами кожу с подкожно-жировой клетчаткой, начиная от уровня подъязычной кости по средней линии вниз до уровня яремной вырезки. По бокам от трахеи находили обе ЩЖ, аккуратно выпрепаровывали из ложа и удаляли. Обе ЩЖ немедленно после удаления помещали в охлажденный (40С) раствор среды 199, в который добавляли кристаллический пенициллин из расчета 100 единиц на 1 мл.

Приготовление культуры тиреоцитов

Извлеченные в стерильных условиях ЩЖ тщательно отмывали в физиологическом растворе 0,9% NaCl с антибиотиками. Срок тепловой ишемии материала составлял не более 10 минут. Глазными пинцетами удаляли капсулу ЩЖ и прослойки соединительной ткани с кровеносными сосудами. Декапсулированную ЩЖ переносили на часовое стекло и разрезали на фрагменты размером 0,5-1 мм, которые многократно отмывали физиологическим раствором от крови. После этого их заливали раствором фермента (коллагеназа) для фрагментации тканей на 10-15 минут при температуре 370С. Затем обработанную ферментным препаратом клеточную суспензию тщательно отмывали средой 199. Суспензию переносили в стерильные культуральные матрацы, заливали соответствующим количеством питательной среды DMEM с фетальной эмбриональной сывороткой (Sigma). Инкубацию культуры проводили в термостате при 370С (CO₂ – 5%). Функциональную активность культуры исследовали с помощью набора РИА для определения Т3 и Т4 (РИА-Т3, Т4-СТ, ИБОХ АН Беларуси) в культуральной жидкости, а также световой микроскопией с использованием инвертированного микроскопа.

Результаты и обсуждение

Наблюдения, проведенные с помощью светового микроскопа, показали, что во время инкубации значительная часть микрофрагментов ЩЖ последовательно проходит дифференцировку в фолликулоподобные кластеры, включая стадию

полного монослоя. Характерной особенностью монослойной культуры ЩЖ является быстрое формирование монослоя, который состоит из тесно прилегающих друг к другу эпителиальных полигональных клеток, содержащих в цитоплазме мелкую зернистость (Рис.3,4).

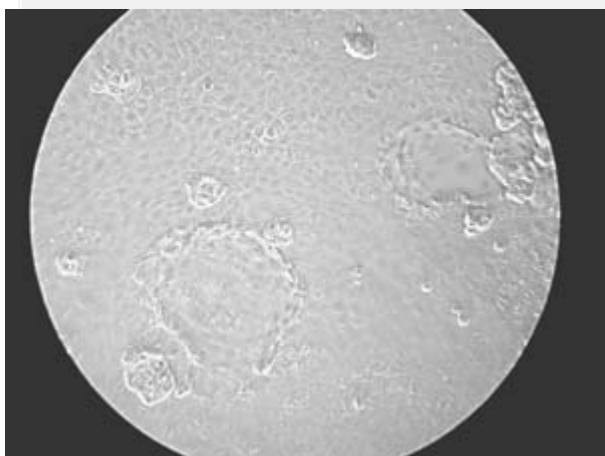
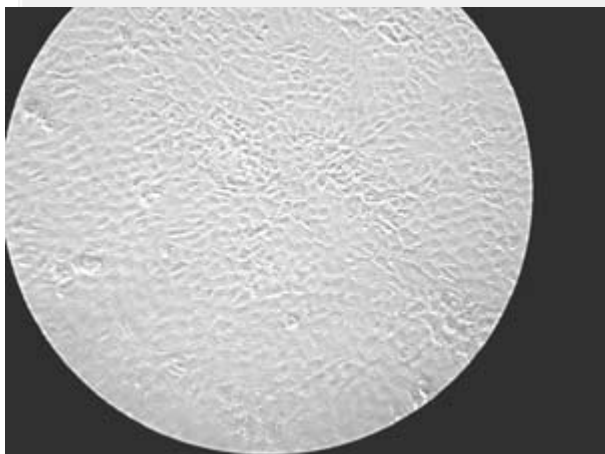


Рис.3,4. Структура монослойной культуры тиреоцитов. Микрофото. УВ – 40, ОК – 10.

Органотипические культуры имеют более сложную структуру. Форма их, как правило, сферическая или овоидная, размер – до 300 мкм. Паренхиму органотипических культур составляют группы эпителиальных клеток, расположенных компактно в виде островков и тяжей, или формирующих везикулы, содержащие коллоид эозинофильного характера (рис.5,6.). На ранних стадиях культивирования эпителиальные клетки, входящие в состав тяжей, островков и окаймляющие везикулы, делятся митозом. В процессе культивирования отдельные фолликулы лизируются с образованием так называемых “теней”.

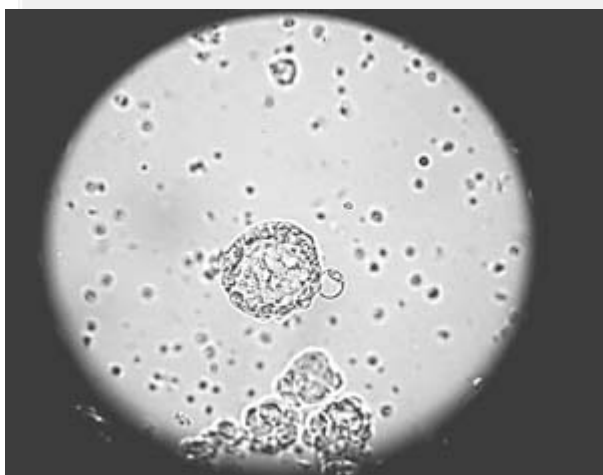
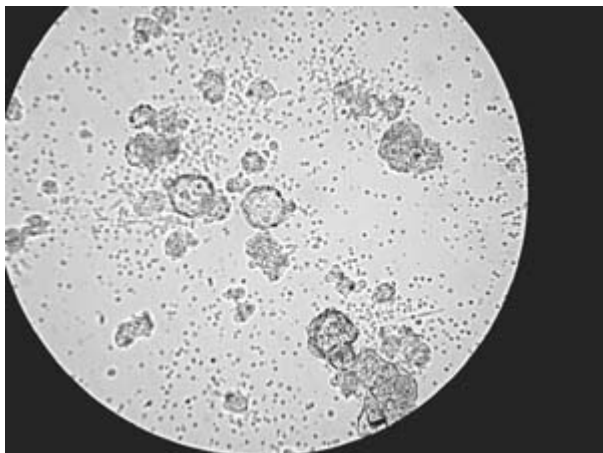


Рис.5,6. Группы эпителиальных клеток (тиреоцитов), формирующие тиреоидные фолликулы. Микрофото. УВ – 40, ОК – 10.

Таким образом, зрелая культура ТЦ представляет собой фолликулоподобные образования, развитие которых характеризуется своеобразными морфогенетическими процессами. Полностью сформированные культуры, в некоторой степени подобны миниатюрной ЩЖ, состоящие из ТЦ, сгруппированных или несгруппированных в везикулы, лишенных васкуляризации и иннервации. ТЦ, выстилающие полость фолликулов, в большинстве случаев имеют кубическую или призматическую форму, характерную для функционирующих фолликулов. Важно отметить, что в процессе культивирования происходит элиминация лейкоцитов-пассажиров (passenger-leucocytes) – ко-стимуляторов иммунного ответа, в связи с чем можно ожидать существенное снижение иммуногенности получаемой культуры клеток ЩЖ. При воздействии на культивированные ТЦ ТТГ (5,0-10,0 мЕд/мл) наблюдается рост в популяции активных фолликулообразующих и гормонпродуцирующих клеток.

Органотипические культуры ТЦ, полученные с помощью разработанной нами методики из ЩЖ новорожденных кроликов, являются активными продуцентами тиреоидных гормонов. Для определения гормонпродуцирующей активности полученных культур ТЦ были отобраны пробы культуральной жидкости. Гормоны, характерные для ЩЖ, выявлялись на протяжении всего срока культивирования на уровне физиологических значений. После полной замены ростовой среды исходная концентрация гормонов восстанавливалась в течение двух суток при стимуляции ТТГ.

Выводы

Таким образом, описанная методика может быть использована для получения культуры ТЦ из фетальной ЩЖ кроликов. Полученные клеточные культуры сохраняют в общих чертах свою морфологическую характеристику и эндокринную функцию: способны образовывать фолликулы, коллоидное вещество и синтезировать гормоны, свойственные этой железе. Полученные нами экспериментальные результаты по пересадке фетальной культуры ТЦ кроликов в сосудистое русло, свидетельствуют о возможности их применения для трансплантации при лечении первичного гипотиреоза.

Литература

1. Аширов А.А. Хронические тиреоидиты. Вопросы хирургической патологии щитовидной железы, Ленинград, 1977, с. 77-81.
2. Блюмкин В.Н., Бабилова Р.А., Скалецкий Н.Н. и др. Флотирующие культуры, полученные из щитовидной железы плодов человека и животных. – Трансплантация и искусственные органы. – М., 1986. – С.92-94.
3. Гнилорыбов Т.Е. Гомотрансплантация эндокринных желез // Трансплантация органов и тканей. – М., 1966. С. 667.
4. Калинин А.П., Киселева Т.П. Аутоиммунный тиреоидит: Методические рекомендации, Москва, 1991, 19 с.
5. Кипренский Ю.В., Ермакова И.П., Аметов А.С. и др. Микрохирургическая аллотрансплантация щитовидно-паращитовидного комплекса // Современные проблемы экспериментальной и клинич. эндокринологии: Тез. докл. IV съезда эндокринол. Укр.ССР – Киев, 1987. – С.176-177.
6. Скалецкий Н.Н., Загребина О.В. Флотирующие культуры, получаемые из щитовидной железы плодов человека и трансплантация их больным гипотиреозом // Трансплантация органов. – Львов, 1990. – С.124-125.
7. Степура Н.М., Зубкова Г.А. Антигенные свойства ткани щитовидной железы новорожденных поросят в процессе культивирования // Матер. III науч. симп. “Актуальные проблемы экологии, клинической иммунологии и инфекционной патологии”. – Луганск. – 1995. – С. 113-114.
8. Трансплантология. Руководство для врачей / Под ред. В.И.Шумакова. – М.: Медицина, 1995. – 575 с.
9. Черенько М.П. Место хирургического метода лечения тиреоидных заболеваний. В кн.: Заболевания щитовидной железы и околощитовидных желез. Тез. докл. Всесоюз. симп. по хирург. эндокринологии. Харьков, 1991, с. 124-125.
10. Bauer M.F., Herzog V. Mini Organ Culture of Thyroid Tissue: A New Technique for Maintaining the Structural and Functional Integrity of Thyroid Tissue in Vitro. Laboratory Investigation. – 1988. – Vol.59. – P.281-291.
11. Over O., Lagsteger N. Klinik der Autoimmunothyreo pathien. Acta Med. Austr, 1994,21(1):1-7.
12. Parr E.L., Bowen K.M., Lafferty K.J. Cellular Changes In Cultured Mouse Thyroid Glands and Islets of Langerhans // Transplantation, 1980, v. 30, p.135-141.