

ХАРАКТЕРИСТИКА ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ИЗ НЕОНАТАЛЬНОЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ СВИНЕЙ: ФОЛЛИКУЛОГЕНЕЗ, ГОРМОНАЛЬНАЯ И РОСТОВАЯ АКТИВНОСТЬ

© С. Б. Билявская,¹ Г. А. Божок,¹ Е. И. Легац,¹ И. А. Боровой,² И. М. Гелла,²
Ю. В. Малюкин,² Т. П. Бондаренко¹

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины

²Институт сцинтилляционных материалов НАН Украины, Харьков;

¹электронный адрес: s_bilyavskaya@mail.ru

Впервые проведена комплексная оценка пролиферативной и гормональной активности первичной культуры клеток, полученной из неонатальной щитовидной железы свиней. Изучены базальная и стимулированная секреция тироксина, а также морфологические особенности культуры в зависимости от исходного состояния материала, помещаемого в условия культивирования, — в виде либо одиночных клеток, либо фолликулярных конгломератов. Для стимуляции секреции тироксина в среду культивирования вводили тиреотропный гормон (ТТГ). В культуре наблюдали спонтанный и стимулированный ТТГ (хронически) фолликулогенез, а также формирование куполообразных структур. Показана способность клеток экспрессировать β -III-тубулин при длительном культивировании в присутствии фактора NGF.

Ключевые слова: щитовидная железа, первичная культура, фолликул, тироцит, тироксин, тиреотропный гормон гипофиза.

Принятые сокращения: ПК — первичная культура, ТТГ — тиреотропный гормон, ФКФ — фолликулярно-клеточная фракция, ФФ — фолликулярная фракция, ЩЖ — щитовидная железа, NGF — фактор роста нервов, PI — иодистый пропидий.

Первичные культуры (ПК) клеток эндокринных желез являются общепринятым объектом для изучения основных проблем клеточной биологии, в том числе ростовой активности, организации цитоскелета и органелл, особенностей регуляции синтеза и секреции гормонов.

ПК клеток щитовидной железы (ЩЖ) получают от человека (Coclet et al., 1989; Toda et al., 1992) и многих видов животных (Kerkof et al., 1964; Remy et al., 1983; Yip et al., 1995; Roger et al., 1997), в том числе из эмбриональных желез (Huber, Davies, 1990) и опухолей (Хоруженко, 2002; Lan et al., 2007; Fierabracci et al., 2008). Однако почти не встречается работ, посвященных изучению пролиферативной и гормональной активности клеток неонатальной ЩЖ млекопитающих.

Известно, что ЩЖ во взрослом состоянии имеет низкую скорость обновления клеток — приблизительно 5 делений в течение жизни (Coclet et al., 1989). После рождения масса железы увеличивается параллельно с массой тела, а затем остается стабильной на протяжении всей взрослой жизни (Dumont et al., 1992). Таким образом, надо полагать, что процесс активной пролиферации клеток присущ железе в период раннего постнатального развития.

Увеличение клеточной массы ЩЖ возможно за счет деления как дифференцированных тироцитов (Ramelli et al., 1982; Coclet et al., 1989), так и стволовых (прогениторных) клеток, локализованных в органе (Hoshi et al.,

2007; Fierabracci, 2012) или поступающих из костного мозга (Mikhailov et al., 2012).

ПК клеток ЩЖ, полученная путем трипсинизации, при поддержании в обычных условиях культивирования представляет собой монослой. Однако функциональной единицей ЩЖ является трехмерно-организованный фолликул. Важность поддержания *in vitro* фолликулярной организации, при которой сохраняется апикально-базальная полярность тиреоидного эпителия, подчеркивали разные авторы (Kogai et al., 2000; Хоруженко, 2002; Bernier-Valentin et al., 2006), однако другие не обнаруживали необходимости сохранения фолликулярной структуры культивируемого материала (Roger et al., 1997).

Цель настоящей работы — изучение пролиферативной и гормональной активности ПК клеток ЩЖ новорожденных поросят в зависимости от исходного состояния помещаемого в условия культивирования материала — в виде одиночных клеток, или фолликулярных конгломератов.

Материал и методика

Для выделения клеток использовали ЩЖ поросят 1—2-суточного возраста. ЩЖ выделяли в стерильных условиях и помещали в охлажденный раствор питательной среды DMEM/Ham's F12, содержащей 100 Ед/мл

пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Железы измельчали на фрагменты площадью 2—3 мм² и трижды отмывали тем же раствором. Фрагменты подвергали 3-этапной ферментативной дезагрегации в растворе, содержащем 1 мкг/мл коллагеназы типа I A и 0.1 мкг/мл дезоксирибонуклеазы при 37 °С. После каждого этапа ферментации смесь собирали в пробирки с эмбриональной телячьей сывороткой и помещали на лед. На последнем этапе ферментативной обработки ткань осторожно пипетировали, полученные клетки отмывали 3 раза с помощью центрифугирования в охлажденной среде, содержащей 0.2 % бычьего сывороточного альбумина. Полученную суспензию фракционировали путем последовательной фильтрации через фильтры (Consalt T. S., Италия) с диаметрами пор 120 и 30 мкм. Таким образом получали фолликулярную фракцию (ФФ), содержащую только фолликулы и их конгломераты, и фолликулярно-клеточную фракцию (ФКФ), содержащую одиночные клетки и микрофолликулы.

Культура клеток ФФ с плотностью $(0.3—1) \cdot 10^5$ фолликулов на 1 см² и ФКФ с плотностью $(0.5—1) \cdot 10^6$ фолликулов и клеток на 1 см² культивировали в планшетах 24V (РАА, Австрия) и культуральных флаконах (РАА, Австрия) на среде DMEM/Ham's F12, обогащенной 10 % эмбриональной сыворотки и содержащей 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 5 мкг/мл амфотерицина В, при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂ в течение 16 сут. Замену среды осуществляли каждые 3 сут. Жизнеспособность клеток после получения определяли с помощью окрашивания трипановым синим.

В части экспериментов ПК клеток ЩЖ хронически стимулировали тиреотропным гормоном (ТТГ), внося в питательную среду тиреотропин в концентрации 10 МЕд/мл в течение всего срока культивирования начиная с 1-х сут. Активность роста клеток оценивали путем их подсчета в камере Горяева на разных сроках культивирования. Для этого клетки дезагрегировали путем инкубации в 0.25%-ном растворе трипсина, смешанном с раствором Версена (РАА, Австрия) в соотношении 1 : 1, при 37 °С в течение 3 мин с последующим добавлением питательной среды DMEM/Ham's F12, содержащей 5 % эмбриональной сыворотки, снимали с подложки пипетированием до открепления монослоя и центрифугировали при 1000 об/мин.

Ядра клеток окрашивали флуоресцентными красителями Hoechst 33342 и иодистым пропидием (PI): после удаления питательной среды клетки инкубировали в растворах, содержащих 5 мкг/мл Hoechst 33342 (в течение 90 мин), или 1 мкг/мл PI (в течение 20 мин). Перед микроскопированием клеток красители отмывали средой DMEM/Ham's F12. Использовали длины волн возбуждения и эмиссии 350 и 455 нм соответственно.

Зоны пролиферативной активности клеток визуализировали с помощью флуоресцентного красителя CFSE, добавляемого в среду культивирования в концентрации 5 мкг/мл. Окрашивание проводили в течение 15 мин при 37 °С и при постоянном встряхивании, удаляли краситель, после чего среду заменяли на культуральную. Флуоресцентную микроскопию клеток проводили в течение 6 сут, используя длины волн возбуждения и эмиссии 492 и 518 нм соответственно. Интенсивность флуоресценции клеток оценивали с помощью программы AxioVision Rel.4.7 (Carl Zeiss, Германия).

Содержание тироксина в среде культивирования ПК клеток ЩЖ определяли радиоиммунологическим ме-

тодом с использованием стандартного тест-набора RIAT4Kit (Immunotech, Франция). Пробы для определения тироксина отбирали на следующие сутки после полной замены среды в процессе культивирования. Концентрацию гормона пересчитывали на концентрацию клеток в исследуемых культурах. Экспрессию β-III-тубулина в ПК клеток ЩЖ определяли через 16 сут культивирования в присутствии 10 нг/мл фактора NGF (Sigma, США). После фиксации в 4%-ном параформальдегиде (Sigma, США) в течение 15 мин клетки обрабатывали 0.1%-ным сапонином (Calbiochem, США) и инкубировали в 5%-ной нормальной сыворотке козла (Sigma, США) в течение 1 ч. Мечение первичными антителами к β-III-тубулину (mouse monoclonal, клон TU-20, разведение 1 : 500; Abcam, Великобритания) проводили в течение 2 ч при комнатной температуре, после чего клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором и инкубировали с вторыми FITC-конъюгированными антителами (goat anti-mouse, разведение 1 : 1000; Abcam) в течение 30 мин.

Для фазово-контрастной и флуоресцентной микроскопии использовали конфокальный лазерный микроскоп Carl Zeiss Axio Observer Z1 (Германия), для обработки изображения — программу AxioVision Rel.4.7 и LSM Image Examiner (Carl Zeiss, Германия).

В работе использовали питательные среды производства РАА (Австрия) и Sigma (США), антибиотики, ферменты, эмбриональную сыворотку, бычий сывороточный альбумин, ТТГ, флуоресцентные красители — фирмы Sigma (США).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента для значений с нормальным распределением и критерия Манна—Уитни — для небольших выборок без учета распределения значений. Эксперименты повторяли трижды, опытные варианты дублировали в каждом эксперименте ($n = 9$).

Результаты

Жизнеспособность ПК клеток ЩЖ, полученной из ФФ, составляла 95.8 %, ФКФ — 86.4 %. ФФ в основном была представлена крупными и средними фолликулами и их конгломератами диаметром от 30 до 120 мкм (рис. 1, а), а ФКФ — мелкими фолликулами (< 30 мкм) и несколькими популяциями клеток — тироцитами, эритроцитами, клетками стромы и эндотелия (рис. 1, б).

После помещения в условия культивирования клетки и фолликулы прикреплялись к субстрату. Выселение клеток из материнских фолликулов происходило через 1 сут культивирования. На 3-и сут культивирования вокруг материнских фолликулов наблюдали участки монослоя (рис. 1, в, г), причем количество таких зон роста в ПК клеток ЩЖ, полученной из ФФ, было больше, чем в культуре, полученной из ФКФ.

К 6-м сут культивирования ФФ формировался конфлюэнтный монослой преимущественно из эпителиоидных клеток, которые равномерно распределялись на подложке, имели полигональную форму, крупное ядро с двумя или несколькими ядрышками (рис. 2, а). В это же время в ФКФ монослой составлял в среднем 70 % и в основном состоял из эпителиоидных клеток. В краевых зонах клеточного пласта наблюдали участки фибробластоподобных клеток (рис. 2, б).

На 6—7-е сут в культурах, полученных из обеих фракций, наблюдали процессы организации двух морфо-

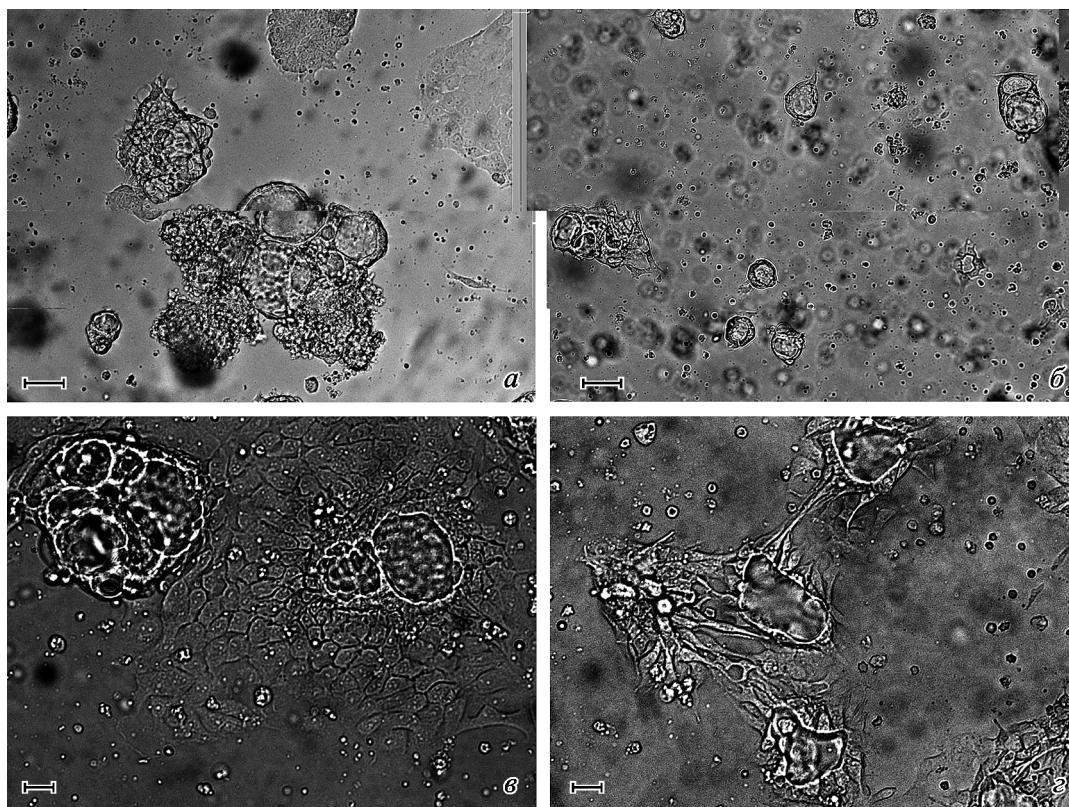


Рис. 1. Прикрепление, расплывание и появление зон роста клеток в культуре фолликулярной фракции (а, б) и фолликулярно-клеточной фракции из щитовидной железы свиньи (в, г) через 1 (а, б) и 3 (в, г) сут культивирования.

Фазово-контрастная микроскопия. Масштабные отрезки — 50 (а, б) и 20 (в, г) мкм.

логически разных типов трехмерных структур. Во-первых, формировались зоны, состоящие из фолликулоподобных структур с полостями, окруженными плотно упакованными клетками (рис. 2, в). Во-вторых, из эпителиоидных клеток образовывались куполообразные домены, возвышающиеся над монослоем (рис. 2, г).

На 10-е сут монослой уплотнялся, клеточные домены объединялись, внутри некоторых из них формировались фолликулоподобные структуры (рис. 2, д). Характерная особенность монослоя на этом сроке культивирования заключалась в наличии внутри клеток ФФ и ФКФ многочисленных крупных и мелких везикул (рис. 2, е), которые, сливаясь друг с другом, образовывали более крупные наполненные полости. Подобный процесс был описан при культивировании клеток ЩЖ человека и свиньи и рассматривается в качестве одного из типов фолликулогенеза (Toda et al., 2001a, 2001b).

Для исследования пролиферативной активности оценивали прирост клеток в культуре в течение 16 сут (рис. 3). Кривая роста культуры, полученной из ФФ, характеризовалась равномерным распределением клеток по клеточному циклу в геометрической прогрессии. Фаза экспоненциального роста начиналась через 48 ч после пассажа и продолжалась в течение 6 сут с увеличением концентрации клеток в 4 раза через 2 сут и последующим удвоением количества через 3 и 6 сут культивирования. Фаза стационарного роста начиналась на 5—6-е сут, клетки замедляли рост и приобретали терминальную плотность, когда монослой достигал 100 %.

Кривая роста ФКФ отличалась от ФФ (рис. 3) наличием фазы относительного покоя в течение 48 ч после

прикрепления. Экспоненциальный рост начинался через 72 ч с выходом на плато через 7—8 сут культивирования, после чего начиналась фаза стационарного роста. При дальнейшем культивировании в монослое наблюдали плотную упаковку клеток, наличие заворотов и вертикальных клеточных выростов.

Комплексная оценка структурно-функционального состояния ПК клеток ЩЖ включала в себя еще исследование апоптоза и зон пролиферации клеток с помощью окрашивания флуоресцентными красителями Hoechst 33342 и CFSE. Комплекс Hoechst 33342 с ДНК используется для количественного измерения ДНК и качественного анализа ядер клеток (Сибирцев, 2007). Известно, что характерными признаками апоптоза являются утрата межклеточных контактов, блеббинг, дегидратационное сжатие клеток, разрушение цитоскелета, фрагментация ядер, конденсация хроматина и деградация ДНК (Широква, 2007). Одним из показателей апоптоза в культуре является окрашивание клеточных ядер Hoechst 33342 (Hawley, Hawley, 2004). В клетках ПК ЩЖ мы в основном наблюдали округлые крупные ядра с интенсивной флуоресценцией (рис. 4, а). На 6-е сут в культурах, полученных из обеих фракций, наблюдали незначительную фрагментацию ДНК, составляющую 0.1—0.5 %.

Для визуализации зон пролиферативной активности ПК клеток ЩЖ использовали флуоресцентный краситель CFSE, который имеет свойство ковалентно связываться с внутриклеточными белками и распределяться при делении клеток. При этом снижается интенсивность флуоресценции дочерних клеток (Luzyanina et al., 2007; Yates et al., 2007).

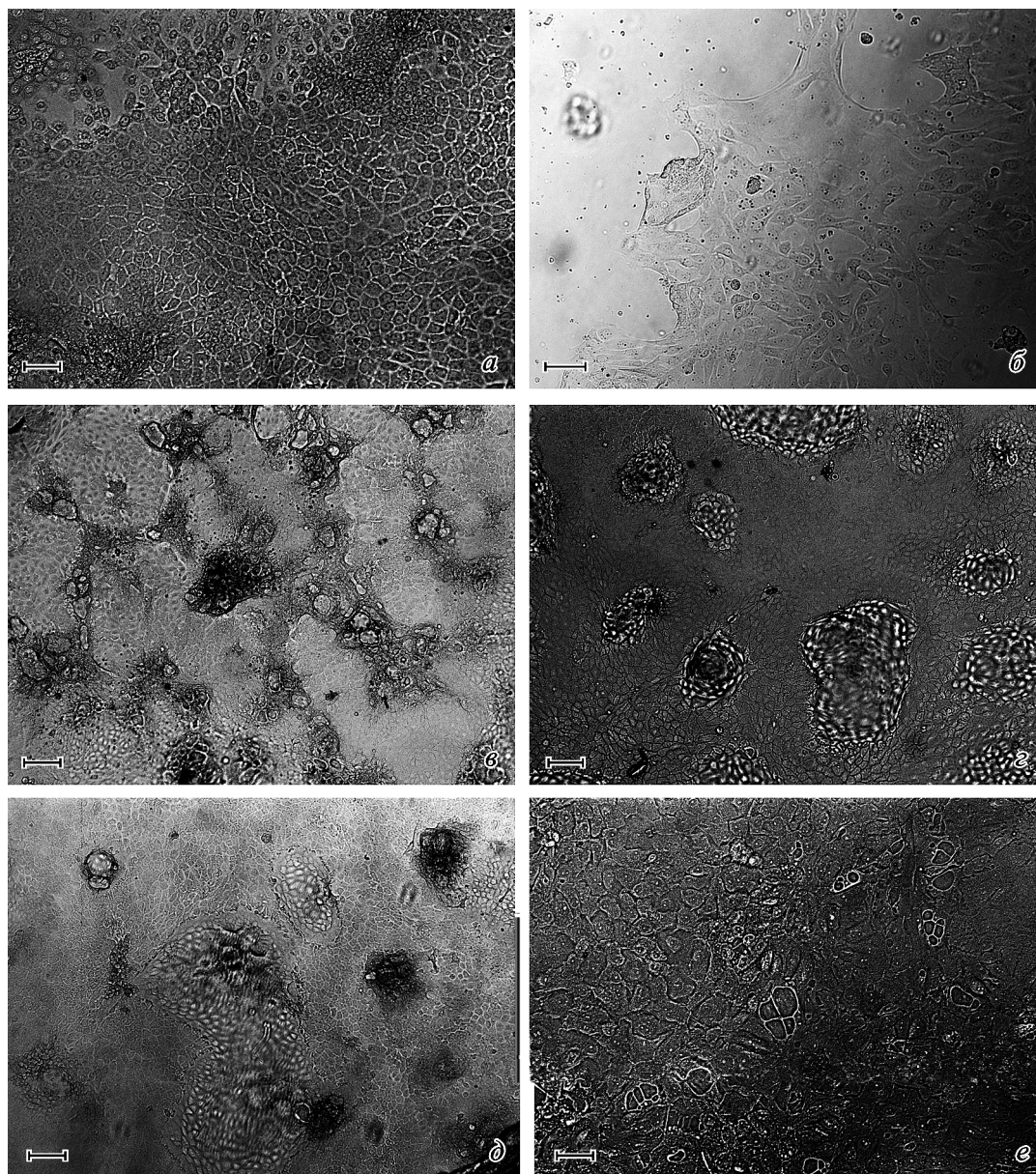


Рис. 2. Формирование монослоя клетками фолликулярной фракции (а) и фолликулярно-клеточной фракции (б) на 6-е сут культивирования, образование фолликулоподобных (в) и куполообразных (г) структур в фолликулярной фракции и фолликулярно-клеточной фракции, формирование фолликулоподобных структур внутри купола (д) и фолликулогенез (е) на 10-е сут культивирования фолликулярной фракции и фолликулярно-клеточной фракции.

Фазово-контрастная микроскопия. Масштабные отрезки — 50 (а, б, е) и 100 (в—д) мкм.

На следующие сутки после окрашивания в обеих культурах наблюдали клетки, имеющие как интенсивную, так и пониженную флуоресценцию. Распределение таких клеток было равномерным по всему монослою (рис. 4, б). Визуально не было отмечено зон клеток, имеющих anomalно высокую интенсивность флуоресценции, что означало бы торможение митотической активности в этих местах. Это свидетельствовало о том, что процессы пролиферации клеток проходят в культурах равномерно. На 6-е сут после окрашивания интенсивность флуоресценции в клетках обеих культур снижалась в среднем в 2 раза (рис. 4, в, г).

Гормональную активность ПК клеток ЩЖ, полученных из ФФ и ФКФ, изучали по уровню тироксина Т4, секретруемого в среду культивирования. Базальный уро-

вень Т4 в среде культивирования клеток ПК, полученной из ФФ, был выше по сравнению с ФКФ (рис. 5). Концентрация Т4 в среде культивирования ФФ на 2-е сут составляла 102.2 ± 2.9 нмоль/л, тогда как в культуре, полученной из ФКФ, в это же время уровень Т4 составлял в среднем 43.2 ± 1.2 нмоль/л. При культивировании клеток ФФ наблюдали постепенное снижение секреции гормона, особенно в течение первых 3 сут культивирования. На 6-е сут уровень Т4 составлял 84.4 ± 10.9 нмоль/л ($P < 0.05$), а на 16-е — 53 ± 1.5 ($P < 0.05$). При культивирования клеток ФКФ уровень Т4 не изменялся в течение 8 сут культивирования, после чего на 10-е сут уменьшался до 32.9 ± 6.8 нмоль/л ($P < 0.05$).

Снижение синтеза тироксина в ПК клеток ЩЖ наблюдали и в других работах (Fayet et al., 1982; Roger

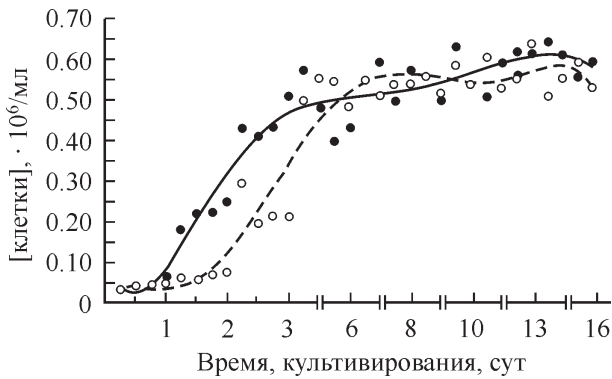


Рис. 3. Изменение пролиферативной активности клеток первичной культуры щитовидной железы из фолликулярной фракции (черные точки) и фолликулярно-клеточной фракции (белые точки), в течение 16 сут культивирования.

Точки — значения, полученные для каждого случая; линии — полиномиальная аппроксимация.

et al., 1997) и связывают его с уменьшением способности клеток к дейодированию тиреоглобулина при переходе от нативной фолликулярной организации к монослойной (Roger, Dumont, 1983).

Секреция Т4 клетками ПК, полученной из ФФ, увеличивалась по сравнению с базальным уровнем гормона через 24 ч после стимуляции ТТГ (внесения в среду) (рис. 5). Продолжение культивирования в присутствии ТТГ приводило к уменьшению реакции клеток на стимуляцию через 3—6 сут и ее отсутствию через 8 сут. В ПК

клеток, полученной из ФКФ, не наблюдали изменения уровня Т4 в ответ на добавление ТТГ на всем сроке культивирования.

ТТГ, по мнению многих авторов, является необходимым фактором фолликулогенеза при культивировании клеток ЩЖ (Dumont et al., 1992; Kogai et al., 2000; Lan et al., 2007). Анализируя данные морфологии клеток ПК, культивированной в присутствии ТТГ, мы не заметили значительного влияния стимулятора на фолликулогенез. Образование фолликулоподобных структур наблюдалось и в культурах, стимулированных ТТГ, и в контрольных, полученных из обеих фракций. Однако клетки культур в присутствии ТТГ отличались быстрым нарастанием большего количества крупных доменов, приобретающих фолликулоподобное строение и равномерно распределенных по всей площади монослоя (рис. 6, а).

При послойном сканировании домена с помощью конфокального лазерного микроскопа видно, что он представляет собой трехмерную замкнутую структуру с полостью внутри. Стенки домена представлены кубическим эпителием с физиологической пространственной организацией (рис. 6, б), разделяющим полость на ячейки фолликулярного строения (рис. 6, в), дно купола также выстлано эпителием, на поверхности которого начинает формироваться небольшая фолликулоподобная структура темного цвета, состоящая из плотно упакованных клеток (рис. 6, г), основная часть которой расположена в середине домена (рис. 6, в).

Известно, что ткань ЩЖ состоит из гетерогенной популяции клеток, включающей в себя функционально различные типы клеток, имеющие разных предшественни-

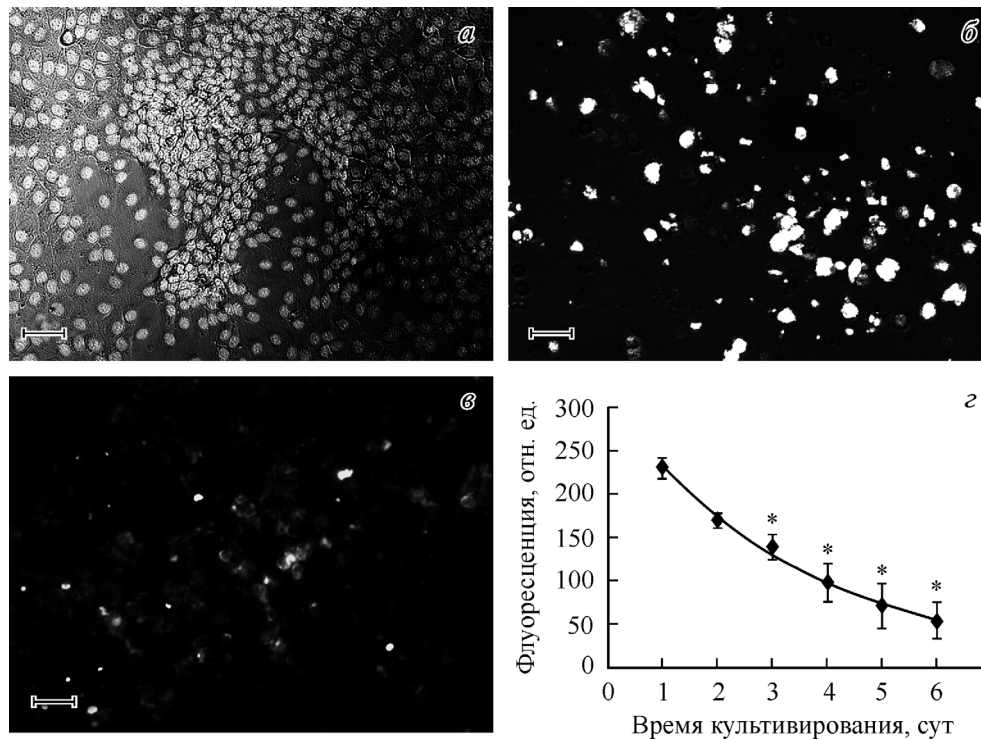


Рис. 4. Визуализация ядер и деления клеток в первичной культуре щитовидной железы с помощью красителей Hoechst 33342 (а) и CFSE (б, в).

а—в — флуоресцентная микроскопия; а — округлые крупные ядра с интенсивной флуоресценцией без признаков апоптоза; б, в — уменьшение флуоресценции клеток на 2-е и 6-е сут после окрашивания соответственно; г — изменение интенсивности флуоресценции клеток во времени: точки — средние значения из 10 полей зрения; линия — экспоненциальная аппроксимация, звездочкой показана достоверность различия по сравнению с 1-ми сутками ($P < 0.05$). Масштабные отрезки — 50 мкм.

ков, происходящих от всех трех эмбриональных зародышевых листков: предшественников фолликулярных клеток эндодермального происхождения, клеток мезодермального происхождения, поддерживающих микроокружение, и парафолликулярных клеток нейрального происхождения (Thomas et al., 2006; Fierabracci, 2012). Возможность дифференцировки клеток, полученных из ЩЖ, в нейрональном направлении была показана в ряде работ (Fierabracci et al., 2008; Suzuki et al., 2011).

Предположив, что неонатальная ткань ЩЖ может содержать пул стволовых клеток, обладающих достаточной пластичностью, мы предприняли попытку дифференцировать клетки ПК в нейрональном направлении. Для этого клетки ФФ и ФКФ культивировали в течение 16 сут в присутствии фактора NGF, после чего исследовали экспрессию β -III-тубулина. Тубулин — это основной белок микротрубочек цитоскелета, а его изотип β -III является компонентом нейротрубочек и широко используется в качестве нейронального маркера (Коржевский и др., 2010). Мы показали, что клетки, полученные как из ФФ, так и из ФКФ, экспрессировали этот маркер (рис. 7).

В культуре клеток, полученных из ФФ, интенсивное окрашивание имели крупные многоотростчатые клетки, расположенные на монослое из эпителиоподобных клеток (рис. 7, а). В культуре, полученной из ФКФ, присутствовали как многоотростчатые, так и фибробластоподобные клетки, экспрессирующие β -III-тубулин (рис. 7, б). ФФ и ФКФ, культивированные без NGF, не экспрессировали β -III-тубулин, их состав был более однороден с преобладанием эпителиоидных клеток.

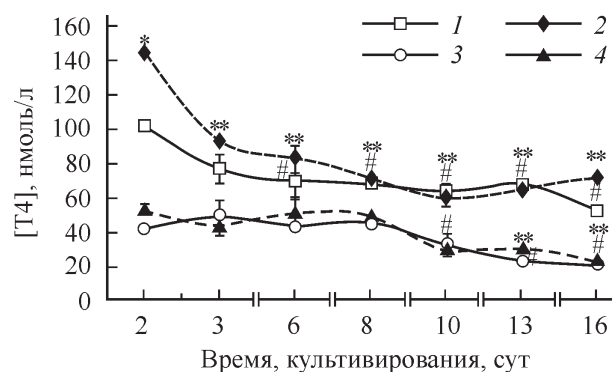


Рис. 5. Изменение уровня секреции Т4 клетками культуры, полученной из фолликулярной фракции (1, 2) и фолликулярно-клеточной фракции (3, 4) щитовидной железы при стимуляции ТТГ в концентрации 10 мЕд/мл.

1, 3 — базальный уровень, 2, 4 — после стимуляции; тиреотропный гормон вводили в среду на протяжении всего срока культивирования начиная с 1-х сут. Достоверность различий уровня Т4 ($P < 0.05$) по сравнению с базальной секрецией соответствующей группы показана одной звездочкой, по сравнению со стимулированной секрецией на 2-е сут — двумя звездочками, по сравнению с базальной секрецией на 2-е сут культивирования — решеткой (#).

Обсуждение

Для изучения поведения клеток млекопитающих *in vitro* и *in vivo* наряду с эмбриональными тканями и тканями взрослого организма особое место занимает неона-

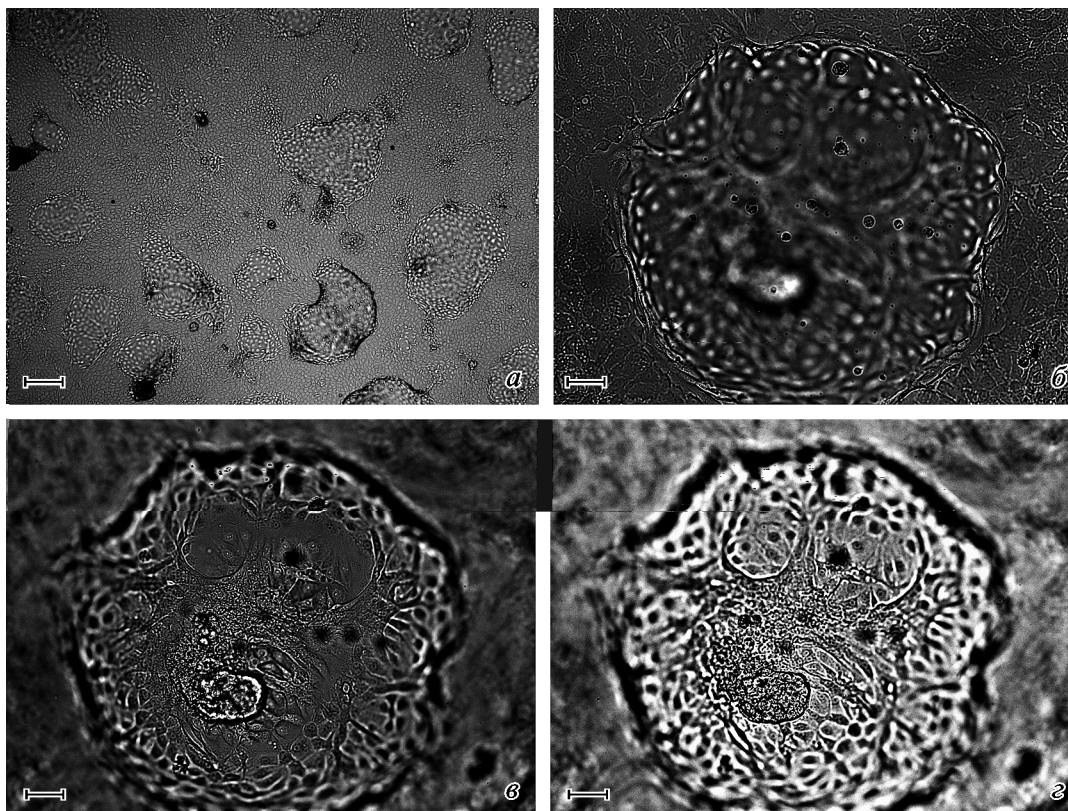


Рис. 6. Формирование клеточных доменов (а) в условиях хронической ТТГ-стимуляции на 6-е сут культивирования первичной культуры клеток щитовидной железы.

Послойное сканирование домена: б — вершина, в — середина, г — дно. Масштабные отрезки — 200 (а) и 50 (б–г) мкм.

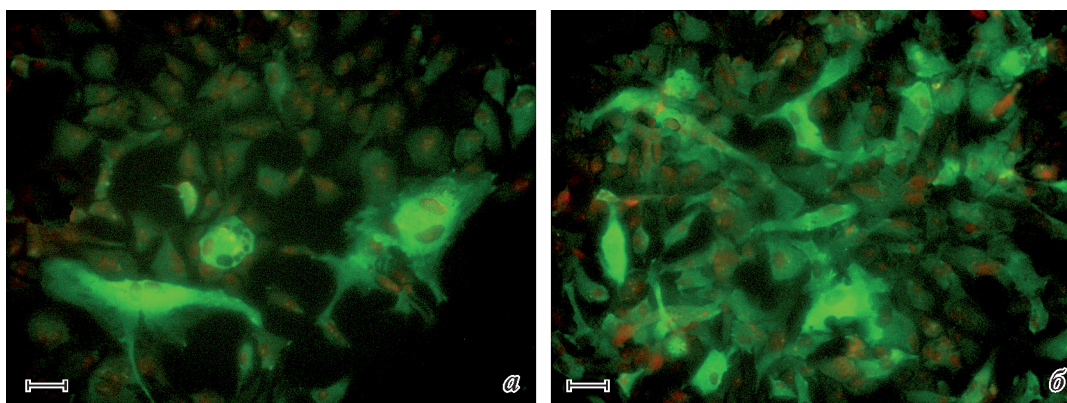


Рис. 7. Экспрессия *Orchidaceae*-III-тубулина клетками первичной культуры, полученной из фолликулярной фракции (а) и фолликулярно-клеточной фракции (б) щитовидной железы на 16-е сут культивирования в присутствии NGF.

Ядра клеток окрашены иодистым пропидием. Масштабные отрезки — 20 мкм.

тальная ткань, которая является активно пролиферирующей клеточной системой и имеет популяции стволовых (прогениторных) клеток. Для создания условий, способствующих поддержанию эндокринных клеток *in vitro*, принято считать наиболее удачными 3D-модели, отражающие природную структурно-функциональную организацию желез. Преимущество культивирования ЩЖ в виде фолликулов по сравнению с монослойной системой было показано во многих работах. При получении культур из нормальной ткани железы человека или узлового зоба наличие тироглобулина было установлено лишь в условиях индукции фолликулярной организации клеток (Хоруженко, 2002). В одной из работ (Kogai et al., 2000) наблюдали значительное уменьшение захвата иодида клетками ЩЖ человека, культивируемыми в виде монослоя. Это, вероятнее всего, связано с уменьшением экспрессии Na^+/I -симпортера, которое показано в другой работе (Bernier-Valentin et al., 2006) при сравнительном анализе особенностей ПК фолликулярной или монослойной организации из ЩЖ свиньи.

Основываясь на предпосылке, что пролиферативный и гормональный потенциал клеток ЩЖ зависит от исходного состояния культивируемого материала, мы предприняли попытку получить фолликулы, не разрушая их целостность и сохраняя их конгломераты при определенных условиях ферментации ткани. Для сравнения использовали материал, полученный при обычных условиях и состоящий из мелких фолликулов и одиночных клеток.

При исследовании гормональной активности культуры, полученной из неонатальной ЩЖ, мы установили влияние способа получения клеток на уровень гормонов: более высокий уровень Т4 наблюдался в культуре, полученной из ФФ, чем в культуре из ФКФ. При анализе пролиферативной активности двух фракций отмечена повышенная скорость роста клеток ФФ, что также свидетельствует о важности сохранения фолликулярной организации при получении культуры клеток из ЩЖ.

В литературе описано несколько типов трехмерных клеточных структур, возникающих при культивировании клеток ЩЖ различного происхождения в обычных или специальных условиях — фолликулоподобные (Fayet et al., 1982; Yap et al., 1995; Kogai et al., 2000; Bernier-Valentin et al., 2006; Nobuo et al., 2007), куполообразные структуры (Tonoli et al., 2000; Toda et al., 2001a, 2001b) и

многоклеточные сфероиды (Хоруженко, 2002; Lan et al., 2007; Fierabracci et al., 2008).

Формирование фолликулов в монослойной, 3D- и органотипической культурах подробно описано в исследованиях Тода с коллегами (Toda et al., 2001a, 2001b, 2003). Фолликулогенез в монослойной культуре начинается с образования мелких внутриклеточных везикул, которые впоследствии сливаются в общую межклеточную полость. В органотипической и 3D-культурах, кроме описанного возможен фолликулогенез из материнского фолликула посредством отпочковывания от него или деления его полости. В полученной нами культуре клеток неонатальной ЩЖ свиньи мы наблюдали фолликулогенез путем образования внутриклеточных полостей и их слипания.

Зависимость фолликулогенеза от присутствия ТТГ в среде культивирования обсуждалась во многих работах (Dumont et al., 1992; Kogai et al., 2000; Lan et al., 2007). Однако некоторые исследования указывают на возможность формирования фолликулов в ПК клеток ЩЖ без ТТГ, например при достаточно высокой (0.5—0.75 млн клеток/см²) плотности посева клеток (Bernier-Valentin et al., 2006), при культивировании в средах с низким содержанием сыворотки (Fayet et al., 1982; Kogai et al., 2000), при использовании желатиновой (Takasu et al., 1979) или коллагеновой (Toda et al., 2003) подложки. Мы не наблюдали значительного влияния присутствия ТТГ в среде культивирования на фолликулогенез ПК клеток ЩЖ, возможно за счет высокой плотности посева клеток.

Появление куполообразных структур в монослое описано при культивировании клеток эпителия кишечника (Whitehead et al., 2008), почки (Park et al., 2010), эпидидимуса (Byers et al., 1992). В культурах, полученных из ЩЖ свиньи, также наблюдается куполообразная организация клеток (Tonoli et al., 2000; Toda et al., 2001a, 2001b). Природа этого явления до конца не выяснена. Одни авторы считают данные образования областями слабого прикрепления клеток к субстрату (Sugahara et al., 1984), тогда как большинство исследователей связывают феномен с активным транспортом воды, ионов и накоплением внеклеточной жидкости под куполом, состоящим из эпителиальных клеток (Lechner et al., 2011). Эпителий многих органов ответствен за формирование и поддержание обособленных отсеков с содержанием веществ, отличным от состава внешней среды. Это достигается за счет сущест-

вождения трансэпителиального барьера, а также направленного транспорта электролитов, энергетических субстратов, белков и т. п.

Тода с коллегами (Toda et al., 2001a, 2001b) не наблюдали клеток внутри куполообразных доменов в ПК клеток ЩЖ, тогда как мы обнаружили присутствие клеток, организованных в фолликулярные структуры, как в полости, так и прикрепленные к подложке на дне домена. Более того, в присутствии ТТГ увеличивались количество и размер доменов.

Известно, что ТТГ является фактором пролиферации и дифференцировки клеток ЩЖ (Dumont et al., 1992; Rostiglione et al., 2002). Гормон индуцирует дифференцировку зрелых тиреоцитов посредством экспрессии специфических генов, взаимодействуя с мембранным рецептором (рТТГ). Формирование в ПК под влиянием ТТГ большого количества крупных доменов, имеющих внутри фолликулоподобные структуры, приводит к мысли о том, что в процесс формирования куполообразных структур также вовлечены процессы пролиферации и фолликулогенеза тиреоцитов. К такому же выводу пришли и другие авторы, наблюдавшие трансформацию доменов в замкнутые фолликулярные структуры, особенно выраженную в присутствии дибутирил-цАМФ (Tonoli et al., 2000).

Мультиклеточные образования сферической формы характерны для культур, выделенных из эмбриональных и опухолевых тканей, что объясняется присутствием в них популяции стволовых (прогениторных) клеток (Rohani et al., 2008; Hirschhaeuser et al., 2010). Описано получение сфероидов в культуре, полученной из узлового зоба ЩЖ (Lan et al., 2007). Показано, что в составе основной популяции клеток ЩЖ мышей находится небольшой пул стволовых клеток, обладающих медленным ростом и отсутствием дифференцировки (Nobuo et al., 2007). Описана способность стволовых клеток, изолированных из нормальной ЩЖ человека, дифференцироваться в нейроноподобные клетки и экспрессировать β -III-тубулин в условиях сокультивирования с клетками линии нейробластомы LAN5 (Fierabracci et al., 2008).

В нашей работе при длительном культивировании в присутствии NGF в ПК клеток ЩЖ формировались колонии, экспрессирующие β -III-тубулин. Позитивно-окрашенные клетки имели многоотростчатую или фибробластоподобную форму, что отличало их от исходной эпителиоидной морфологии монослоя.

Локализация стволовых клеток в ЩЖ изучена, показано, что клетки, экспрессирующие эндодермальные маркеры Oct-4 и GATA-4, а также АТФ-зависимый транспортный белок ABCG2, который широко представлен в стволовых (прогениторных) клетках, локализуются в основном в межфолликулярной зоне (Thomas et al., 2006; Nobuo et al., 2007; Davies et al., 2011). Мы не наблюдали зависимости экспрессии β -III-тубулина от сохранности межфолликулярных зон в качестве «ниши» стволовых клеток, так как позитивно-окрашенные клетки были представлены в культурах, полученных как из конгломератов фолликулов (ФФ), так и из одиночных клеток (ФКФ).

Показано, что β -III-тубулин может экспрессироваться в дендритных клетках лимфоузлов (Lee et al., 2005), фибробластах, кератиноцитах, опухолях молочной и поджелудочной желез (Jouhilahti et al., 2008), клетках опухолей глиального происхождения (Katsetos et al., 2002), в астроцитах наряду с астроцитарным маркером GFAP

(Dráberová et al., 2008). С одной стороны, возможно, что клетки, экспрессирующие β -III-тубулин в ПК клеток ЩЖ, не относятся к нейроноподобным. Однако весьма вероятно, что появление этого маркера в клетках культуры может подтверждать наличие стволовых клеток в полученной нами культуре неонатальной ЩЖ и являться признаком их нейрональной дифференцировки под воздействием ростовых факторов.

В заключение можно сказать, что ПК клеток, полученная из неонатальной ЩЖ свиней, представлена в основном эпителиоидными клетками с функциональной принадлежностью к фолликулярному эпителию и является гормонально активной, быстро пролиферирующей системой, способной к фолликулогенезу. Исходное состояние помещаемого в условия культивирования материала в виде фолликулярных конгломератов имеет позитивное влияние на активность роста и гормональную продукцию ПК неонатальной ЩЖ. Способность к экспрессии β -III-тубулина клетками культуры в условиях индукции дифференцировки в нейрональном направлении может быть связана с наличием в ней стволовых (прогениторных) клеток и требует проведения дальнейших исследований по идентификации таких популяций.

Работа выполнена при финансовой поддержке Украинского научно-технического центра в рамках программы «Целевые исследования и развивающие инициативы» (проект 5509).

Список литературы

- Коржевский Д. Э., Петрова Е. С., Кирик О. В., Безнин Г. В., Сухорукова Е. 2010. Нейральные маркеры, используемые при изучении дифференцировки стволовых клеток. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 5 (3) : 57—63.
- Сибирцев В. С. 2007. Флуоресцентные ДНК-зонды: исследование механизмов изменения спектральных свойств и особенностей практического применения. Биохимия. 72 (8) : 1090—1106.
- Хоруженко А. И. 2002. Новые методические подходы к культивированию тиреоцитов *in vitro* с сохранением их фолликулярной структуры. Эксперим. онкол. 2 : 99—104.
- Широкова А. В. 2007. Апоптоз. Сигнальные пути и изменение ионного и водного баланса клетки. Цитология. 49 (5) : 385—394.
- Bernier-Valentin F., Troutet-Masson S., Rabilloud R., Selmi-Ruby S., Rousset B. 2006. Three-dimensional organization of thyroid cells into follicle structures is a pivotal factor in the control of sodium/iodide symporter expression. *Endocrinology*. 147 (4) : 2035—2042.
- Byers S. W., Citi S., Anderson J. M., Hoxter B. 1992. Polarized functions and permeability properties of rat epididymal epithelial cells *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* 95 (2) : 385—396.
- Coclet J., Foureau F., Ketelbant P., Galand P., Dumont J. E. 1989. Cell population kinetics in dog and human adult thyroid. *Clin. Endocrinol.* (Oxford). 31 : 655—665.
- Davies T. F., Latif R., Minsky N. C., Ma R. 2011. Clinical review: the emerging cell biology of thyroid stem cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96 : 2692—2702.
- Dráberová E., Del Valle L., Gordon J., Markova V., Smejkalová B., Bertrand L., de Chadarevian J. P., Agamanolis D. P., Legido A., Khalili K., Draber P., Katsetos C. D. 2008. Class III beta-tubulin is constitutively coexpressed with glial fibrillary acidic protein and nestin in midgestational human fetal astrocytes: implications for phenotypic identity. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67 : 341—354.
- Dumont J. E., Lamy F., Roger P., Maenhaut C. 1992. Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and

- differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol. Rev.* 72 : 667—697.
- Fayet G., Hovsepian S., Dickson J. G., Lissitzky S. 1982. Reorganization of porcine thyroid cells into functional follicles in a chemically defined, serum- and thyrotropin-free medium. *J. Cell. Biol.* 93 : 479—488.
- Fierabracci A. 2012. Identifying thyroid stem/progenitor cells: advances and limitations. *J. Endocrinol.* 213 : 1—13.
- Fierabracci A., Puglisi M. A., Giuliani L., Mattarocci S., Galinella-Muzi M. 2008. Identification of an adult stem/progenitor cell-like population in the human thyroid. *J. Endocrinol.* 198 (3) : 471—487.
- Hawley T. S., Hawley R. G. 2004. *Methods in molecular biology: flow cytometry protocols*, 2nd ed. New York: Humana Press Inc. 425 p.
- Hirschhaeuser F., Menne H., Dittfeld C., West J., Mueller-Klieser W., Kunz-Schughart L. A. 2010. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. *J. Biotechnol.* 148 : 3—15.
- Hoshi N., Kusakabe T., Taylor B. J., Kimura S. 2007. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics. *Endocrinology.* 148 : 4251—4258.
- Huber G. K., Davies T. F. 1990. Human fetal thyroid cell growth *in vitro*: system characterization and cytokine inhibition. *Endocrinology.* 126 : 869—875.
- Jouhilahti E. M., Peltonen S., Peltonen J. 2008. Class III beta-tubulin is a component of the mitotic spindle in multiple cell types. *J. Histochem. Cytochem.* 56 : 1113—1119.
- Katsetos C. D., Del Valle L., Geddes J. F., Aldape K., Boyd J. C., Legido A., Khalili K., Perentes E., Mörk S. J. 2002. Localization of neuronal class III beta-tubulin in oligodendrogliomas. Comparison with Ki-67 proliferative index and 1p/19q status. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 61 : 307—320.
- Kerkof P. R., Long P. J., Chaikoff I. L. 1964. *In vitro* effects of thyrotropic hormone on the pattern of organization of monolayer cultures of isolated sheep thyroid gland. *Cell. Endocrinol.* 74 : 170—179.
- Kogai T., Curcio F., Hyman S., Cornford E. M., Brent G. A., Hershman J. M. 2000. Induction of follicle formation in long-term cultured normal human thyroid cells treated with thyrotropin stimulates iodide uptake but not sodium/iodide symporter messenger RNA and protein expression. *J. Endocrinol.* 167 : 125—135.
- Lan L., Cui D., Nowka K., Derwahl M. 2007. Stem cells derived from goiters in adults form spheres in response to intense growth stimulation and require thyrotropin for differentiation into thyrocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92 : 3681—3688.
- Lechner J., Hekl D., Gatt H., Voelp M., Seppi T. 2011. Monitoring of the dynamics of epithelial dome formation using a novel culture chamber for long-term continuous live-cell imaging. *Methods Mol. Biol.* 763 : 169—178.
- Lee S., Choi K., Ahn H., Song K., Choe J., Lee I., Tu J. 2005. Class III beta-tubulin expression suggests dynamic redistribution of follicular dendritic cells in lymphoid tissue. *Eur. J. Cell Biol.* 84 : 453—459.
- Luzyanina T., Roose D., Schenkel T., Sester M., Ehl S., Meyerhans A., Bocharov G. 2007. Numerical modelling of label-structured cell population growth using CFSE distribution data. *Theor. Biol. Med. Model.* 24 : 26.
- Mikhailov V. M., Sokolova A. V., Serikov V. B., Kaminskaya E. M., Churilov L. P., Trunin E. M., Sizova E. N., Kayukov A. V., Bud'ko M. B., Zaichik A. Sh. 2012. Bone marrow stem cells repopulate thyroid in X-ray regeneration in mice. *Pathophysiology.* 19 : 5—11.
- Nobuo H., Takashi K., Taylor B. J., Kimura S. 2007. Side population cells in the mouse thyroid exhibit stem/progenitor cell-like characteristics. *Endocrinology.* 148 : 4251—4258.
- Park K. M., Fogelgren B., Zuo X., Kim J., Chung D. C., Lipschutz J. H. 2010. Exocyst Sec10 protects epithelial barrier integrity and enhances recovery following oxidative stress, by activation of the MAPK pathway. *J. Physiol. Renal. Physiol.* 298 : F818—F826.
- Postiglione M. P., Parlato R., Rodriguez-Mallon A., Rosica A., Mithbaokar P., Maresca M., Marians R. C. 2002. Role of the thyroid-stimulating hormone receptor signaling in development and differentiation of the thyroid gland. *PNAS.* 99 : 15 462—15 467.
- Ramelli F., Studer H., Bruggisser D. 1982. Pathogenesis of thyroid nodules in multinodular goiter. *Amer. J. Pathol.* 109 : 215—223.
- Remy L., Verrier B., Michel-Bechet M., Mazzella E., Athouel-Haon A. M. 1983. Thyroid follicular morphogenesis mechanism: organ culture of the fetal gland as an experimental approach. *J. Ultrastruct. Res.* 82 : 283—295.
- Roger P. P., Christophe D., Dumont J. E., Pirson I. 1997. The dog thyroid primary culture system: a model of the regulation of function, growth and differentiation expression by cAMP and other well-defined signaling cascades. *Eur. J. Endocrinol.* 137 : 579—598.
- Roger P. P., Dumont J. E. 1983. Thyrotrophin and the differential expression of proliferation and differentiation in dog thyroid cells in primary culture. *J. Endocrinol.* 96 : 241—249.
- Rohani L., Karbalaie K., Vahdati A., Hatami M., Nasr-Esfahani M. H., Baharvand H. 2008. Embryonic stem cell sphere: a controlled method for production of mouse embryonic stem cell aggregates for differentiation. *Int. J. Artif. Organs.* 31 : 258—265.
- Sugahara K., Caldwell J. H., Mason R. J. 1984. Electrical currents flow out of domes formed by cultured epithelial cells. *J. Cell Biol.* 99 : 1541—1544.
- Suzuki K., Mitsutake N., Saenko V., Suzuki M., Matsuse M., Ohtsuru A., Kumagai A., Uga T., Yano H., Nagayama Y., Yamashita S. 2011. Dedifferentiation of human primary thyrocytes into multilineage progenitor cells without gene introduction. www.plosone.org. 6 : 193—154.
- Takasu N., Charrier B., Mauchamp J., Lissitzky S. 1979. Effect of gelatin on the cyclic AMP response of primocultured hog thyroid cells to acute thyrotropin stimulation. *Biochim. biophys. acta.* 587 : 507—514.
- Thomas T., Nowka K., Lan L., Derwahl M. 2006. Expression of endoderm stem cell markers: evidence for the presence of adult stem cells in human thyroid glands. *Thyroid.* 16 : 537—544.
- Toda S., Aoki S., Suzuki K., Koike E., Ootani A., Watanabe K., Koike N., Sugihara H. 2003. Thyrocytes, but not C cells, actively undergo growth and folliculogenesis at the periphery of thyroid tissue fragments in three-dimensional collagen gel culture. *Cell Tissue Res.* 312 : 281—289.
- Toda S., Koike N., Sugihara H. 2001a. Cellular integration of thyrocytes and thyroid folliculogenesis: a perspective for thyroid tissue regeneration and engineering. *Endocrinol. J.* 48 : 407—425.
- Toda S., Koike N., Sugihara H. 2001b. Thyrocyte integration, and thyroid folliculogenesis and tissue regeneration: perspective for thyroid tissue engineering. *Pathol. Int.* 51 : 403—417.
- Toda S., Yonemitsu N., Hikichi Y., Sugihara H., Koike N. 1992. Differentiation of human thyroid follicle cells from normal subjects and Basedow's disease in three-dimensional collagen gel culture. *Pathol. Res. Pract.* 188 : 874—882.
- Tonoli H., Flachon V., Audebet C., Calle A., Jarry-Guichard T., Statuto M., Rousset B., Munari-Silem Y. 2000. Formation of three-dimensional thyroid follicle-like structures by polarized FRT cells made communication competent by transfection and stable expression of the connexin-32 gene. *Endocrinology.* 141 : 1403—1413.
- Whitehead R. H., Robinson P. S., Williams J. A., Bie W., Tyner A. L., Franklin J. L. 2008. Conditionally immortalized colonic epithelial cell line from a Ptk6 null mouse that polarizes and differentiates *in vitro*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23 : 1119—1124.
- Yap A. S., Stevenson B. R., Keast J. R., Manley S. W. 1995. Cadherin-mediated adhesion and apical membrane assembly define distinct steps during thyroid epithelial polarization and lumen formation. *Endocrinology.* 136 : 4672—4680.
- Yates A., Chan C., Strid J., Moon S., Callard R., George A. J., Stark J. 2007. Reconstruction of cell population dynamics using CFSE. *BMC Bioinformatics.* 12 : 196.

CHARACTERISTICS OF PRIMARY CELL CULTURE FROM NEONATAL
THYROID GRAND OF PIGS: FOLLICULOGENESIS, HORMONE AND GROWTH

*S. B. Bilyavskaya,¹ G. A. Bozhok,¹ E. I. Legach,¹ I. A. Borovoy,² I. M. Gella,²
Yu. V. Malyukin,² T. P. Bondarenko¹*

¹ Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine NAS of Ukraine
and ² Institute for Scintillation Materials NAS of Ukraine, Kharkov;
e-mail: s_bilyavskaya@mail.ru

In the study, comprehensive assessment of proliferative and hormonal activity of primary cell cultures derived from neonatal pig thyroid has been carried out for the first time. We have evaluated the basal and TSH-stimulated secretion of thyroxine and morphological features of culture, depending on the initial state of the material placed in culture: in the form of single cells or follicular conglomerates. Folliculogenesis and formation of dome structures were observed in culture spontaneous and under chronic TSH stimulation. The ability of the cells to expression of β -III-tubulin during prolonged cultivation in the presence of NGF has been demonstrated in the study.

Key words: thyroid gland, primary culture, follicle, thyrocyte, thyroxine, thyroid-stimulating hormone.