

УДК 576.535:577.175.4

В. Н. НИКАНДРОВ, О. Н. ЖУК, Е. Ф. ПОЛУКОШКО,
М. К. ТУМИЛОВИЧ, П. В. ЕФИМОВА**РАЗВИТИЕ КУЛЬТУРЫ ПАРАЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ПРИ
ВОЗДЕЙСТВИИ БЕЛКОВ РЕГУЛЯТОРНОГО ТИПА***Институт физиологии НАН Беларуси, Минск, Беларусь*

При культивировании эксплантатов ткани паращитовидной железы быка к 28 суткам достигалось наилучшее состояние клеток в культурах ткани. В кондиционированной среде органотипической культуры паращитовидной железы доказано присутствие паратгормона по способности вызывать выход Ca^{2+} из костной ткани крыс *in vitro*, зарегистрированного методом лазерной атомно-эмиссионной спектрометрии. Добавление к зрелым (14 сут) культурам клеток паращитовидной железы в питательную среду стрептокиназы, фактора роста нервов или плазминогена способствовало увеличению зон роста вокруг эксплантата, улучшало прикрепляемость, выживаемость клеток паратироцитов, развитие культуры на ранних стадиях и ее жизнедеятельность. Выявлены особенности изменения активности лактатдегидрогеназы в культуральной жидкости при добавлении этих белков.

Ключевые слова: паращитовидная железа, стрептокиназа, лактатдегидрогеназа.

Раскрытие механизмов регуляции биохимических констант организма животных и человека составляют одну из серьезных задач физиологии, биохимии и фармакологии. К числу констант, играющих ключевую роль в обеспечении витальных функций организма, принадлежит содержание ионов кальция крови. Значение же метаболизма кальция в целом для жизнедеятельности организма невозможно переоценить.

В стабилизации уровня ионов кальция крови первостепенную роль играет функциональная активность клеток паращитовидных желез, продуцирующих специфический гормон регуляции кальциевого обмена. В этой связи особое значение приобретает проблема регуляции функционально-метаболического статуса паратироцитов.

Как мы уже отмечали, функционально-метаболическая специфика клеток ткани паращитовидной железы далека от полной ясности [4]. Данные литературы по этому вопросу весьма многочисленны и фрагментарны. Одним из подходов к разработке указанного направления является получение стабильных культур ткани паращитовидной железы, что является достаточно сложной задачей [5, 8]. Отдельные вопросы физиологии и метаболизма паратироцитов решаются с помощью перевиваемых линий. Этот прием не совсем адекватен, поскольку клетки перевиваемых линий экспрессируют не все белки, свойственные нативным паратироцитам [7].

В предыдущем исследовании нами было описано получение органотипических культур ткани паращитовидной железы, не загрязненных элементами тироидной ткани и сохранявших жизнеспособность в течение 35 сут, дана морфологическая характеристика культур [4]. Более того, удалось получить и диссоциированные культуры клеток этой железы через органотипическую культуру, с пересевом клеток монослоя в пластиковые чашки.

Однако результаты этого этапа наводили на мысль, что дальнейшее успешное продвижение работ в данном направлении возможно лишь при использовании факторов трофической поддержки – белков регуляторного типа.

Цель настоящей работы – изучить особенности развития ткани паращитовидной железы в культуре при воздействии отдельных белков регуляторного типа.

Материалы и методы. Исследования проводились на паразитовидных железах быка, которые в физиологическом растворе доставляли в лабораторию из убойного цеха мясокомбината сразу после извлечения.

В работе использовали питательную среду DMEM, эмбриональную телячью сыворотку крови (ТС) и раствор трипсина (Sigma, США). Остальные реактивы были производства стран СНГ.

Паразитовидную железу отпрепаровывали из комплекса со щитовидной железой, идентифицируя паразитовидную по форме, месторасположению, цвету и микроструктуре [9].

Для получения органной культуры ткань железы разделяли на фрагменты объемом до 2 мм³ и помещали в чашку Петри на покрытые коллагеном предметные стекла. Эксплантаты выращивали в питательной среде DMEM, содержащей 15% ТС и гентамицин, при температуре 37° С в атмосфере 5%-ной CO₂. Спустя 24 ч питательную среду с неприкрепившимися эксплантатами удаляли, культуры промывали раствором Хенкса и добавляли свежую ростовую среду. В дальнейшем смену питательной среды проводили через 48 или 72 ч.

Рост и состояние культур контролировали с помощью прижизненной микроскопии в проходящем свете или при фазовом контрасте. Для морфологической идентификации зону роста органных культур окрашивали гематоксилин-эозином [3].

В кондиционированной среде определяли активность лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27, ЛДГ), локализованной преимущественно в цитозоле, по редукции пирувата, используя оптический тест Варбурга, на спектрофотометре Cary 100 Bio Varian. Активность в исследуемой пробе выражали в Е/л (мкМ/мин × л).

Функциональную активность паратироцитов (продукцию паратгормона) определяли по способности их кондиционированной среды влиять на выход ионов кальция из костной ткани. Для этого костную ткань из берцовых костей семидневных крыс измельчали механически, аликвоты помещали в кондиционированную среду трехдневной культуры паратироцитов. После экспозиции 30 мин при 37 °С в среде измеряли содержание Ca²⁺ методом лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии на лазерном многоканальном атомно-эмиссионном спектрометре LSS-1 на базе физического факультета БГУ.

К зрелым культурам (14 сут) добавляли очищенные образцы стрептокиназы, плазминогена или фактора роста нервов. В процессе дальнейшего роста в культуральной жидкости определяли активность ЛДГ.

Все результаты представлены как среднее арифметическое не менее трех независимых измерений, выполненных в триплетах. Статистическая значимость полученных результатов была оценена при помощи критерия Манна–Уитни для непараметрических выборок. Различия считали значимыми при $P \leq 0,05$. Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0.

Результаты и обсуждение. Культивирование эксплантатов ткани паразитовидной железы проводили вплоть до 40 сут.

Зона роста начинала формироваться уже на 3-и сутки. В культуре идентифицированы морфологически после окраски гематоксилин-эозином эпителиальные железистые клетки и клетки стромы. Скорость их пролиферации была различной. Причем стромальные клетки поддерживали высокую степень дифференцировки и пролиферации. Спустя 3 сут цитоплазма отдельных светлых главных клеток почти не окрашивалась (так называемые «пустые клетки»). Это обусловлено наличием в них гликогена, который не прокрашивался гематоксилином и эозином. Оксифильные клетки в зоне роста отсутствовали. В течение первых 14 сут культивирования эксплантаты прикреплялись к коллагеновой подложке и образовывали концентрично расположенные зоны роста, состоящие из клеток различной морфологии. Они равномерно увеличивались в процессе культивирования и всегда имели резко очерченные края (рис. 1а). К 14-м суткам культуры формировали обширный монослой. В центре эксплантатов и в зоне роста хорошо просматривались клетки с фолликулами (рис. 1 б).

Секреторные клетки находились в окружении клеток другого типа, т. е. получались смешанные культуры. И хотя секреторные клетки размножались медленнее других типов клеток, тем не менее на 14-е сутки они составляли значительную часть популяции. С течением времени морфологическая картина несколько менялась: к 24 суткам в культуре доминировали фибробласты (рис. 2).

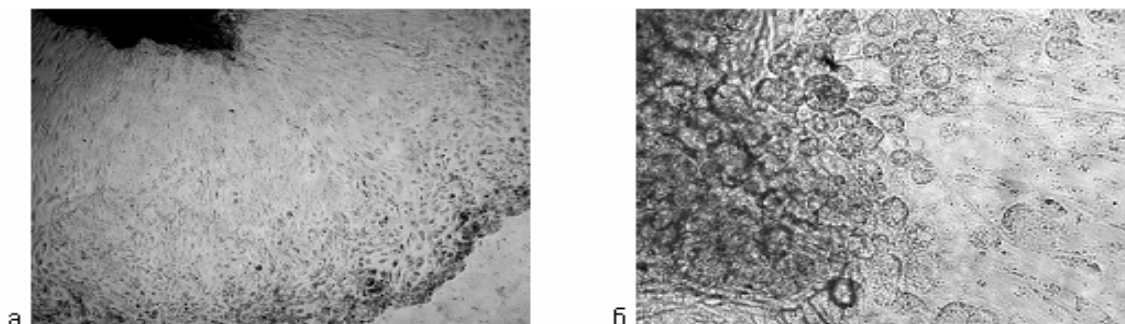


Рис.1. Эксплантат паращитовидной железы с зоной роста, 10 сут, проходящий свет, $\times 10$ (а); паратиреоидные фолликулы в культуре ткани паращитовидной железы, 14 сут, проходящий свет, $\times 20$ (б).

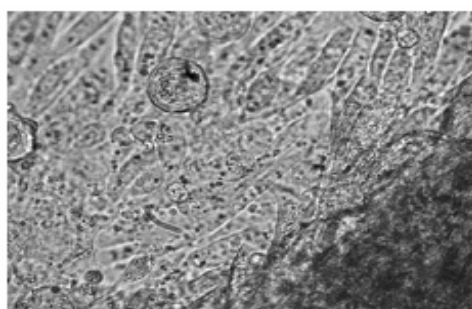


Рис. 2. Культура ткани паращитовидной железы, 24 сут, проходящий свет, $\times 20$

Высокая активность ЛДГ кондиционированной питательной среды в первую неделю, по-видимому, обусловлена гибелью значительного числа клеток в начальный период (рис. 3). В последующем, к 28-м суткам эта активность снижалась практически на порядок.

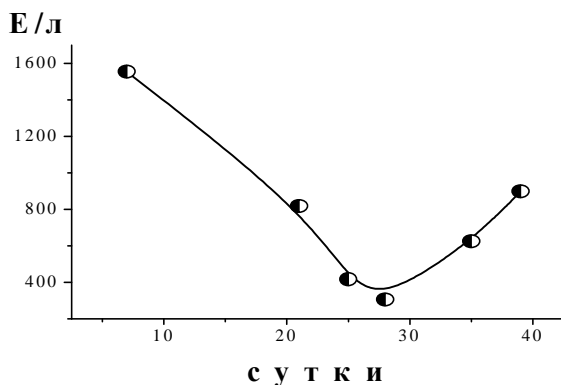


Рис. 3. Изменения активности лактат-дегидрогеназы в кондиционированной среде культур паратиреоидной железы в динамике культивирования

Таким образом, описанная схема культивирования дала возможность получать зрелую жизнеспособную культуру паратиреоцитов вплоть до 35 сут.

Исследования возможности таких культур паращитовидной железы продуцировать паратгормон по способности кондиционированной питательной среды влиять на мобилизацию кальция из костной ткани показали, что при внесении проб костной ткани в кондиционированную среду культуры паращитовидной железы концентрация Ca^{2+} возрастала по сравнению с контролем (проба костной ткани + исходная питательная среда). При этом и в исходной питательной и в кондиционированной средах без костной ткани уровни Ca^{2+} были незначительны и равновелики (рис. 4).

Следовательно, *in vitro* в полученных культурах ткани паратиреоидных желез клетки способны продуцировать субстанцию, регулирующую выход Ca^{2+} из костной ткани, т. е. обладающую главной характеристикой паратгормона.

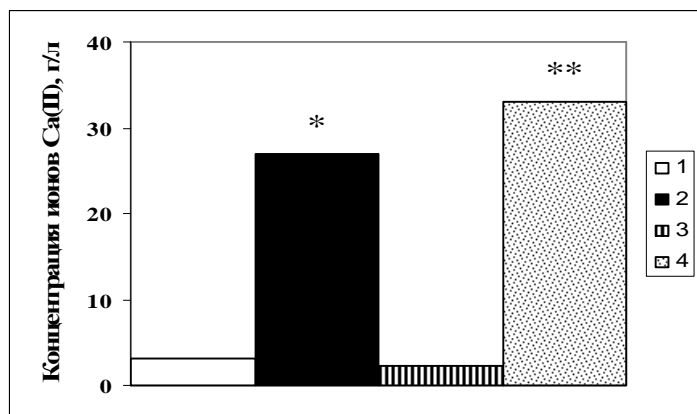


Рис. 4. Влияние кондиционированной среды культуры ткани паратиреоидной железы на мобилизацию кальция из костной ткани крысы:

1 – контроль (питательная среда); 2 – питательная среда + проба костной ткани; 3 – питательная среда + кондиционированная питательная среда; 4 – питательная среда + кондиционированная питательная среда + проба костной ткани. * – различия достоверны, $P \leq 0,05$ между 1 и 2; ** – различия достоверны, $P \leq 0,05$ между 2 и 4

Дальнейшие исследования показали, что добавление в питательную среду стрептокиназы или фактора роста нервов повышало жизнеспособность культур ткани, что выражалось в улучшении прикрепляемости эксплантатов, ускорении формирования ими зоны роста. Судя по полученным данным, на протяжении первых двух суток под действием стрептокиназы уровень активности ЛДГ в кондиционированных средах снижался по сравнению с контролем на 10–14% (рис. 5). Добавление же фактора роста нервов в концентрации 100 нг/мл на протяжении 5 сут также вызвало снижение уровня активности исследуемой дегидрогеназы. Однако эти изменения, как и сдвиги, вызванные в более поздние сроки добавлением стрептокиназы, не были достоверны из-за большого разброса индивидуальных значений. Вместе с тем уменьшение концентрации фактора роста нервов на порядок обусловило снижение уровня активности энзима по сравнению с контролем на 40% к 6-м суткам (рис. 6).

Рис. 5

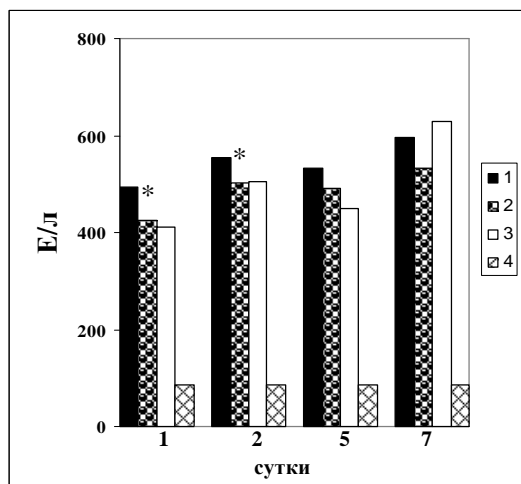


Рис. 6

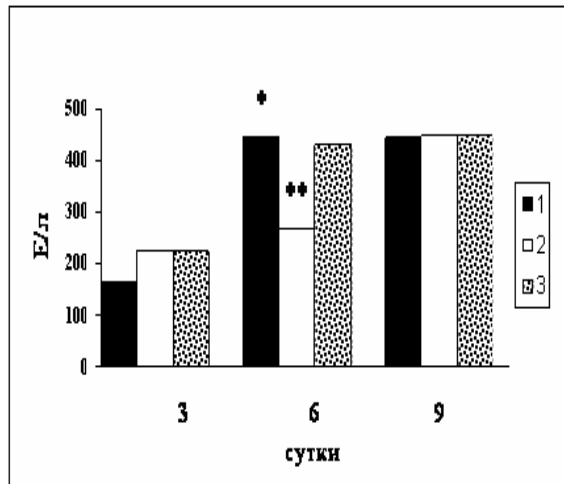


Рис. 5. Влияние стрептокиназы, 2000 МЕ/мл (2) и фактора роста нервов, 100 нг/мл (3) на изменения активности лактатдегидрогеназы в кондиционированной среде культур паразитовидной железы.

1 – контроль (без добавок), 4 – исходная питательная среда. * – здесь и далее изменения достоверные по отношению к контролю, $P \leq 0,05$

Рис. 6. Влияние фактора роста нервов, 10 нг/мл (2) и плазминогена 10^{-7} М (3) на изменения активности лактатдегидрогеназы в кондиционированной среде культур паразитовидной железы.

1 – контроль (без добавок)

Как известно, в результате выпадения или недостаточности функции паразитовидных желез развивается гипопаратиреоз, проявляющийся синдромом гипокальциемии вследствие дефицита паратгормона (паратирина). Снижение содержания Ca^{2+} в крови приводит к росту нервно-мышечной возбудимости и тоническим судорогам. В тяжелых случаях исход летальный. Наиболее распростра-

нен послеоперационный гипопаратиреоз в результате хирургических вмешательств на щитовидной и паращитовидных железах; кроме того, причиной гипопаратиреоза являются радиация, инфекции и др. [9]. Компенсация этой тяжелой эндокринной патологии в настоящее время является процессом перманентным и нелегким для больного. Лекарственные средства не всегда способны стабилизировать гомеостаз, а также чреваты побочными эффектами. В настоящее время наиболее перспективным считают трансплантационный метод лечения гипопаратиреоза с помощью ксенотрансплантации культуры клеток паращитовидных желез [1, 2, 6].

Однако даже само только получение стабильных культур паратироцитов, учитывая сложности методического плана, является весомым и значимым результатом, который найдет применение в экспериментальных исследованиях физиологии и биохимии человека и животных, фармакологии и, возможно, биотехнологии. В данном плане неприемлем вариант смешанных культур «тироциты + паратироциты», использование которых имеет место в клинической медицине.

Литература:

- [1]. Геньк С. Н., Шевчук В. С. Трансплантация околощитовидных желез в эксперименте и клинике // Хирургия. 1986. № 7. С. 147–151.
- [2]. Заверный Г. Л., Рыбаков С. И., Комиссаренко И. В. Лечение послеоперационного гипопаратиреоза методом ксенотрансплантации культуры клеток паращитовидных желез свиньи // Трансплантация органов: Тез. докл. XI Всесоюз. науч. конф. – Львов, 1990. С. 57–59.
- [3]. Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники. Л., Медицина, 1969.
- [4]. Никандров В. Н., Жук О. Н., Полукошко Е. Ф., Тумилович М. К. Структурно-функциональная специфика клеток паращитовидной железы быка в органотипических и диссоциированных культурах // Проблемы регуляции висцеральных функций. Сб. научн. статей. Кн. 1. Минск, 2008. С. 107–111.
- [5]. Никандров В. Н., Жук О. Н., Полукошко Е. Ф., Ефимова П. В. Особенности культивирования ткани паращитовидной железы // Механизмы функционирования висцеральных систем. VII Всероссийск. конфер. с международ. участием, посвящ. 160-летию со дня рождения И. П. Павлова. Тезисы докл., СПб, 2009. С. 310–311.
- [6]. Поташов Л. В. Перспективы трансплантации клеточных культур для коррекции некоторых эндокринных заболеваний // Новые С-Петербург. лечеб. ведомости. 1999. № 1. С. 22–24.
- [7]. De Feo M. L., Bartolini O., Orlando C. et al. Natriuretic peptide receptors regulate endothelin synthesis and release from parathyroid cells // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. Vol. 88. P. 6496–6500.
- [8]. Sakaguchi K., Santora A., Zimering M. et al. Functional epithelial cell line cloned from rat parathyroid glands. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987. Vol. 84. P. 3269–3273.
- [9]. Scanlon E. F., Kellogg J. E., Winchester D. P., Larson R. H. The morbidity of total thyroidectomy // Arch. Surg. 1981. Vol. 116. P. 568–571.

Поступила в редакцию 03. 11. 2009 г.

V. N. NIKANDROV, O. N. ZHUK, E. F. POLUKOSHKO, M. K. TUMILOVICH, P. V. EFIMOVA

DEVELOPMENT OF PARATHYROID GLAND CULTURE UNDER THE ACTION OF PROTEINS OF REGULATORY TYPE

Institute of Physiology, National Academy of Sciences, Minsk, Belarus

Summary

During the cultivation of bovine parathyroid gland explants the best state of cells in the tissue cultures was achieved to 28 days. The presence of parathyrin in conditioned fluid of organotypical culture of parathyroid gland was detected by the ability to cause the Ca^{2+} release from rat osseous tissue in vitro with the help of laser atom-emission spectroscopy. The addition of streptokinase, plasminogen or nerve growth factor at mature (14 days) cultures of parathyroid gland cells to promote the increase of growth zones around the explant, to improve the adhesion, survivability of the parathyroid cells, the earlier development phases of the culture and its vital activity. The features of lactate dehydrogenase activity changes in cultural fluid were demonstrated in the conditions of these protein additions.

Key words: parathyroid gland, streptokinase, lactate dehydrogenase.