

А.В. Павлов, М.В. Шапкина, М.А. Гансбургский, Т.В. Кораблева и И.Е. Беляков*

ПОЛУЧЕНИЕ ИЗОЛИРОВАННЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ЦИТОЛОГИЧЕСКИХ И ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭПИТЕЛИЯ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А.В.Павлов) Ярославской государственной медицинской академии

Подробно описана методика получения хорошего качества мазков тироцитов, изолированных из фрагментов щитовидной железы (ЩЖ) крыс (30 животных) и человека (20 наблюдений) методом ферментативной диссоциации в 0,25% водном растворе коллагеназы (коллагеназа XI типа для выделения панкреатических островков, активность переваривания коллагена 1,205 ЕД/мг, Sigma, USA) при 37 °С в течение 1, 1,5, 2, 2,5 и 3 ч. Оптимальное время диссоциации в каждом конкретном случае определяется на контрольных мазках. Описанный подход позволил успешно проводить морфологический, морфометрический и цитофотометрический анализ железистых клеток, определение относительной частоты разных клеточных типов (митотически делящихся, двоядерных, аберрантных форм с микроядрами) как в эксперименте на животных, так и при различных видах тиреоидной патологии человека.

Ключевые слова: щитовидная железа, тироциты, выделение клеток, мазки, цитогенетические исследования.

Для проведения количественного анализа состояния клеточных популяций (цитометрия, кариометрия, цитофотометрия ДНК, РНК и белков, подсчет содержания редко встречающихся морфологических типов клеток, изучение хромосомных аберраций) по сравнению с исследованием гистологических срезов изучение мазков изолированных клеток является более точным и предпочтительным подходом. Применительно к щитовидной железе (ЩЖ) обычно для этой цели используются мазки-отпечатки или мазки, полученные после тонкоигольной аспирационной пункционной биопсии или трепанобиопсии [6, 7], однако данные методы не всегда позволяют получить достаточное число неразрушенных клеток для морфологического и морфометрического анализа. Более перспективными представляются методы ферментативной диссоциации ткани ЩЖ, позволяющие, наряду с получением мазков, выращивать тироциты в культуре [8]. Целью настоящей работы явилась отработка оптимального метода диссоциации ткани ЩЖ крыс и человека на отдельные клетки с целью получения хорошего качества мазков изолированных тироцитов.

В ходе предварительных исследований проведен сравнительный анализ эффективности разных методов получения изолированных железистых клеток: изучали варианты ферментативной диссоциации трипсином, коллагеназой [3], а также метод щелочной диссоциации предварительно фиксированной формалином ткани [1]. Последний оказался малоприменимым для ЩЖ, так как при

всех режимах обработки вызывал разрушение цитоплазмы значительной части эпителиальных клеток и выход изолированных («голых») ядер.

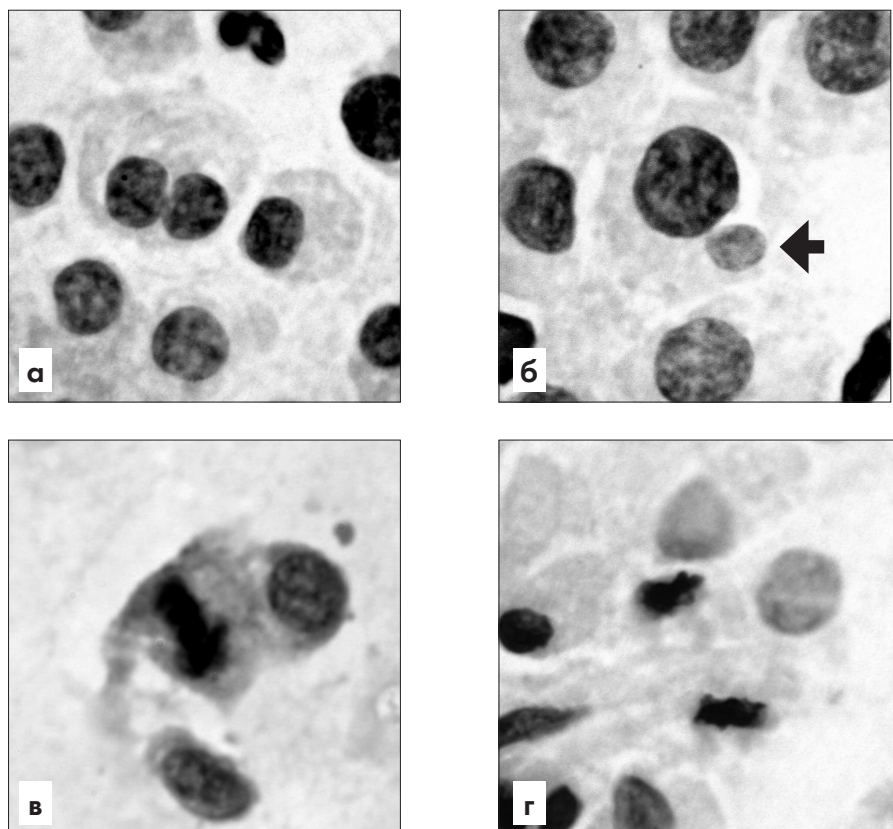
Наилучшим способом получения суспензии тиреоидных клеток, из которой можно получить хорошего качества мазки для микроскопического анализа, оказался метод ферментативной диссоциации коллагеназой (Collagenase for pancreatic islet isolation type XI, активность переваривания коллагена 1,205 ЕД/мг, Sigma, USA).

В качестве материала для диссоциации изучена ЩЖ интактных крыс разного возраста (от рождения до 2,5 лет, всего — 30 животных), а также человека. В последнем случае использовали операционный материал, полученный при тотальной или субтотальной тиреоидэктомии по поводу узловых доброкачественных (микро- и макрофолликулярная аденома, узловой коллоидный зоб, диффузно-узловой токсический зоб) и злокачественных (папиллярный рак) заболеваний органа (всего — 20 наблюдений). Свежие фрагменты удаленной ЩЖ помещали в изотонический раствор при 4 °С на 1,5–2 ч, после чего подвергали ферментативной обработке.

Процесс диссоциации состоит из нескольких этапов.

1. *Разведение коллагеназы.* С целью получения 0,25% раствора фермента 2,5 мг сухой коллагеназы разводят в 1 мл теплого (37 °С) изотонического раствора и помещают в термостат на 10 мин для полного растворения. 1 мл полученного раствора делят на 5 порций (удобно использовать

* e-mail: pavlov@hist.yma.ac.ru



Морфологические варианты тироцитов, изолированных методом ферментативной диссоциации щитовидной железы.

а, г — интактные крысы; б — введение метилнитрозомочевины гемитироидэктомизированным крысам, 4-е сутки опыта; в — щитовидная железа человека (диффузно-узловой токсический зоб). а — двуядерная и одноядерные клетки; б — тироцит с микроядром (стрелка); в, г — митотически делящиеся клетки (в — метафаза, г — телофаза). Фиксация 96% этанолом, окраска по Фельгену и прочным зеленым (а, б, г), галлоцианин-хромовыми квасцами по Эйнарсону и прочным зеленым (в). Об. 90, ок. 10

мелкоячеистый планшет для иммунологических исследований).

2. *Ферментативная диссоциация.* Фрагмент нефиксированной ЩЖ разрезают на 4 части с объемом каждой не более 1 мм³. Кусочки погружают в раствор коллагеназы и помещают в термостат на 1–2,5 ч при температуре 37 °С.

3. *Подбор времени диссоциации.* Оптимальное время диссоциации подбирают экспериментально для каждой партии коллагеназы и вида изучаемого материала (эксперимент на животных, операционный материал). Наибольшие сложности в подборе условий возникают при изучении ЩЖ человека: существенное значение могут иметь возраст и содержание в органе соединительной ткани (особенно при различных вариантах патологии). Берут 4–5 порций раствора фермента с кусочками ЩЖ и помещают в термостат (37 °С) на разное время: 1 ч, 1,5 ч, 2 ч, 2,5 ч, 3 ч. Затем путем изготовления контрольных мазков клеток, их экспресс-окраски 0,1% раствором толуидинового синего в течение 30 с — 1 мин и изучения под микроскопом определяют оптимальное время

диссоциации. При недостаточной экспозиции на мазке будет содержаться много крупных фрагментов и мало отдельных клеток. При чрезмерном воздействии фермента на клетки их цитоплазма отделяется от ядер.

4. *Получение суспензии изолированных клеток.* Фрагменты ЩЖ из раствора коллагеназы переносят на стекло с помощью пипетки, покрывают другим предметным стеклом так, чтобы только одно его ребро соприкасалось с нижним и между ними оказалась капля раствора с кусочком железы. Верхним стеклом аккуратно, но интенсивно двигают вверх-вниз относительно нижнего, при этом кусочек ткани в капле раствора коллагеназы начинает перемещаться, распадаться на все более мелкие фрагменты, что приводит к образованию суспензии, содержащей отдельные клетки.

5. *Получение мазка.* Из полученной суспензии клеток изготавливают мазок с помощью шлифованного стекла, подобно тому, как делают мазок крови и красного костного мозга. Из одной капли суспензии можно приготовить несколько мазков. Препарат подсушивают, фиксируют в 96% этано-

ле или 10% формалине (с последующим споласкиванием в изотоническом растворе и подсушиванием), окрашивают и заключают в бальзам.

Различные морфологические варианты тироцитов на мазках, полученных с помощью данной методики, представлены на рисунке. Использование изолированных тироцитов позволяет успешно проводить морфологический, морфометрический и цитофотометрический анализ железистых клеток, определение относительной частоты разных клеточных типов (митотически делящихся, двоядерных, аберрантных форм с микроядрами) как в эксперименте на животных, так и при различных видах тиреоидной патологии человека [2, 4, 5].

ЛИТЕРАТУРА

1. Белов Л.Н., Коган М.Е., Леонтьева Т.А. и др. Получение изолированных клеток методом щелочной диссоциации фиксированных формалином тканей. Цитология, 1975, т. 17, вып. 11, с. 1332–1338.
2. Гансбургский М.А. Анализ клеток с микроядрами в оценке пролиферации эпителия щитовидной железы: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М., 2005.
3. Методы биологии развития: Экспериментально-эмбриологические, молекулярно-биологические и цитологические. Под ред. Т.А.Детлаф, В.Я.Бродского, Г.Г.Гаузе. М., Наука, 1974.
4. Павлов А.В., Александров Ю.К., Беяков И.Е. и Кораблева Т.В. Частота аберрантных тироцитов при узловых заболеваниях щитовидной железы. В кн.: Биологические эффекты малых доз ионизирующей радиации и радиоактивное загрязнение. Сыктывкар, Изд-во Уральск. отд. РАН, 2006, с. 113.
5. Павлов А.В., Гансбургский А.Н. и Гансбургский М.А. Пloidность микронуклеированных тироцитов, индуцированных введением метилнитрозомочевина. Бюл. exper. биол., 2005, т. 140, вып. 12, с. 695–697.
6. Пинский С.Б., Калинин А.П. и Белобородов В.А. Диагностика заболеваний щитовидной железы. М., Медицина, 2005.
7. Щитовидная железа: Фундаментальные аспекты. Под ред. А.И.Кубарко и С.Ямасита. Минск, Нагасаки, 1998.
8. Penna-Martinez M., Winten C., Fichtel C. et al. Isolation of thyroid cells obtained by fine-needle aspiration biopsy. Thyroid, 2005, v. 15, № 9, p. 989–995.

Поступила в редакцию 14.02.2006 г.

ISOLATION OF THE CELLS FOR CYTOLOGICAL AND CYTOGENETIC STUDIES OF THYROID EPITHELIUM

A.V. Pavlov, M.V. Shashkina, M.A. Gansburgskiy, T.V. Korablyova and I.Ye. Belyakov

This paper presents a detailed description of the method for obtaining of high quality smears of thyrocytes from the fragments of rat (30 animals) and human (20 cases) thyroid gland using the method of enzymatic dissociation in 0.25% aqueous solution of collagenase (collagenase for pancreatic islet isolation type XI, collagen digestive activity 1,205 units/mg, Sigma, USA) at 37°C during 1; 1,5; 2; 2,5 and 3 hours. Optimal time for dissociation in each individual case should be determined using control smears. This approach permitted to successively perform morphological, morphometric and cytophotometric analysis of the glandular cells, to evaluate the relative proportions of different cell types (mitotically dividing cells, binucleate cells, aberrant forms with the micronuclei) in animal experiments as well as in the various types of human thyroid pathology.

Key words: thyroid gland, thyrocytes, cell isolation, smears, cytogenetic studies.

Department of Histology, Cytology and Embryology, Yaroslavl State Medical Academy.