

Органная культура щитовидной железы новорожденных поросят как объект криоконсервирования

С.В. ЛУГОВОЙ¹, Т.П. БОНДАРЕНКО¹, Н.Ф. ГУБИНА¹, А.И. ОЛЕФИРЕНКО², А.А. ОЛЕФИРЕНКО²

¹Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

²Дорожная клиническая больница №1 ст. Харьков-пассажирский МПС Украины

Organ Culture of Newborn Piglets' Thyroid Gland as an Object for Cryopreservation

LUGOVOJ S.V.¹, BONDARENKO T.P.¹, GUBINA N.F.¹, OLEFIRENKO A.I.², OLEFIRENKO A.A.²

¹Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of the Ukraine, Kharkov

²Railway Clinical Hospital N1 of Kharkov-Passenger station of the Ministry of Communications of Ukraine

Проведено исследование функциональных характеристик органной культуры щитовидной железы новорожденных поросят (ОКЩЖНП) при культивировании ее в течение 10 сут в питательных средах различного состава.

Ключевые слова: щитовидная железа, криоконсервирование, тиреоидные гормоны, органная культура.

Проведено дослідження функціональних характеристик органної культури щитовидної залози новонароджених поросят при культивуванні її протягом 10 діб у живильних середовищах різного складу.

Ключові слова: щитовидна залоза, криоконсервування, тироїдні гормони, органна культура.

The investigation of functional characteristics for organ culture of thyroid gland of new born piglets (OCThGNP) was carried-out during its culturing for 10 days in nutrient media of different composition.

Key words: thyroid gland, cryopreservation, thyroid hormones, organ culture.

Трансплантация клеточных и органных культур эндокринных тканей широко применяется в клинической практике для лечения различных эндокринопатий. Предложены различные методы культивирования эндокринных тканей [1,2]. Основная задача при органотипическом культивировании ткани щитовидной железы (ЩЖ) для последующего клинического применения – обеспечение элиминации антигенпредставляющих клеток: passenger лейкоцитов, дендритных клеток, клеток сосудистого эндотелия. Кроме того, искусственная модификация трофики в процессе культивирования позволяет тироцитам адаптироваться к нефизиологическим условиям, что при последующей свободной гетеротопической трансплантации является благоприятным фактором для их приживания в организме реципиента. Известно, что ткань ЩЖ в условиях органного культивирования способна от 3-х до 14-ти суток (в зависимости от метода культивирования) сохранять свои морфологические и функциональные характеристики, адекватно отвечать на действие стимулирующих агентов, а тироциты сохраняют способность к активной пролиферации, синтезу тиреоидных гормонов *de novo* [4, 6-8].

Поскольку в процессе культивирования пос-

The transplantation of endocrine tissues' cellular and organ cultures is widely applied in clinical practice for treating different endocrinopathies. Various methods of endocrine tissues' culturing have been proposed [1, 2]. The main task during organotypical culturing of thyroid gland (ThG) tissue for further clinical application is to provide the elimination of antigen-presenting cells: passenger leukocytes, dendritic cells, vascular endothelium cells. In addition, an artificial modification of trophicity during culturing permits thyrocytes to be adapted under non-physiological conditions, that is a favourable factor for their engrafting into a recipient's organism during the following free heterotopic transplantation. ThG tissue under the organ culturing conditions is known to be able of keeping its morphological and functional characteristics, to adequately respond to the effect of stimulating agents from 3 to 14 days (depending on culturing method), but the thyrocytes preserve the capability of an active proliferation and thyroid hormone synthesis *de novo* [4, 6-8].

Since during culturing the tissue dedifferentiation with the loss of capability to the thyroid hormones' synthesis and secretion occurs gradually, it is necessary to determine an optimal term of its culturing, during which the ThG organ culture does not lose its specific

Адрес для корреспонденции: Луговой С.В. Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 7722007, факс: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Lugovoy S.V. Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +38 (057) 7722007, fax: +38 (057) 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

тепено происходит дедифференцировка ткани с утратой ее способности к синтезу и секреции тиреоидных гормонов, необходимо определить оптимальный срок ее культивирования, в течение которого органная культура ЩЖ не теряет своей специфической функции. Важным показателем функциональной состоятельности ткани ЩЖ в условиях органного культивирования является также ее способность адекватно отвечать на действие стимуляторов гормонопоза. Целью данного исследования было изучение динамики секреции тиреоидных гормонов в процессе культивирования в питательных средах различного состава для определения оптимальных условий культивирования ткани ЩЖ для её последующего криоконсервирования.

Материалы и методы

При культивировании ткани ЩЖ новорожденных поросят за основу нами была взята стандартная методика [3]. Исследовался уровень секреции тиреоидных гормонов ОКЩЖНП с 1-х по 10-е сутки при культивировании ее в средах различного состава. Базовой средой была среда 199 с добавлением 10%-й инактивированной эмбриональной сыворотки теленка и антибиотиков (пенициллин – 100 ед/мл и канамицин – 150 ед/мл). Базовая среда была модифицирована добавлением в нее 75 мкг/мл йодида калия и/или 0,02 мл экстракта гипофиза.

Таким образом, в работе представлены результаты исследований, полученные при использовании различных по составу сред: среда 1- базовая; среда 2 с добавлением 75 мкг/л йодида калия; среда 3 с добавлением 75 мкг/л йодида калия и 0,02 мл/л экстракта гипофиза; среда 4 с добавлением 0,02 мл/л экстракта гипофиза.

Соответственно для органных культур, культивируемых в этих средах, сохранен тот же порядок нумерации. Каждые 24 ч заменяли питательную среду и отбирали пробы для измерения содержания тиреоидных гормонов в среде культивирования радиоиммунологическим методом при помощи наборов РИА- T_3 , T_4 -СТ. Уровень содержания гормонов в культуральной среде пересчитывали на миллиграмм белка гомогената ткани. Измерение белка проводилось по методу Бредфорда. Статистическую обработку результатов выполняли по методу Стьюдента – Фишера. Полученные результаты представлены на рис. 1,2.

Результаты и обсуждение

В первые сутки культивирования наблюдается низкий уровень базальной секреции как T_3 , так и T_4 , что, по-видимому, обусловлено периодом

function. An important index of the ThG tissue functional integrity under conditions of organ culturing is also its capability to adequately respond to the hormonopoiesis stimulators' effect. The aim of this investigation was to study the dynamics of thyroid hormone secretion during culturing in nutrient media of different composition for determining the optimal conditions of ThG tissue culturing for its further cryopreservation.

Materials and methods

We based on the standard technique when culturing the newborn piglets' ThG tissue [3]. The level of the OCThGNP thyroid hormone secretion from the 1st to 10th day was studied when culturing with the solutions of different composition. The medium 199 with the 10% inactivated embryonic calf serum and antibiotics additives (100 unit/ml of penicillin and 150 unit/ml of canamicin) served as the base solution. The base solution was modified by adding 75 mcg/ml potassium iodide and/or 0.02 hypophysis extract.

Thus, the results of investigations, obtained when using the solutions with different composition are presented in the work:

solution 1 is the base one; solution 2 with adding 75 mcg/l of potassium iodide; solution 3 with adding 75 mcg/l of potassium iodide and 0.02 ml/l of hypophysis extract; solution 4 with adding 0.02 ml/l of hypophysis extract.

Correspondingly, the same order of numeration for the cultured in these media organ cultures, is kept. The nutritive medium was changed every 24 hours and the samples were taken for measuring the thyroid hormones' content in cultural medium with the radioimmunological method using the RIA- T_3 , T_4 -ST sets. The protein measurement was measured according to the Bredforde's method. Statistical processing of the results was accomplished by the Student-Fisher method. The results obtained are presented in the Fig. 1, 2.

Results and discussion

In the first day of culturing a low level of basal secretion for both T_3 and T_4 was observed, that, apparently, is stipulated by the period of tissue adaptation to non-physiological conditions. At the same time the tissue, cultured at the presence of hypophysis extract manifested a higher hormonal activity, especially for thyroxin secretion. The presence of potassium iodide in a nutrient medium did not cause a manifested effect on the intensity of hormone secretion.

The growth of both basal and stimulated T_3 and T_4 secretion was observed from the 2nd day, at the same time the level of stimulated secretion exceeded the level of basal one in 2.5 times in average. No statistical

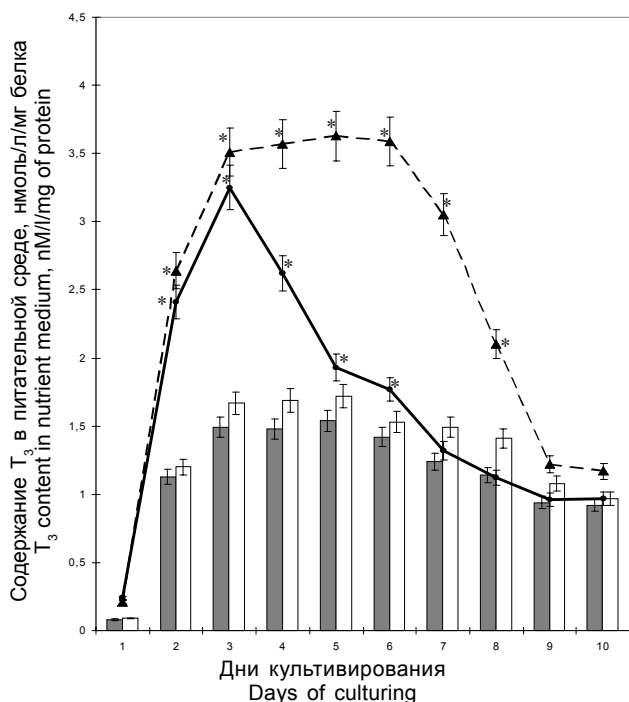


Рис. 1. Уровень секреции T_3 ОКЩЖНП.
 ■ - среда 1; □ - среда 2; ▲ - среда 3; ● - среда 4.

Fig. 1. Level of T_3 secretion of OChThNP.
 ■ - solution 1; □ - solution 2; ▲ - solution 3; ● - solution 4.
 * - $P < 0,05$ по сравнению с базовой средой (среда 2).
 * - $P < 0.05$ in comparison with the base solution (solution 2).

адаптации ткани к нефизиологическим условиям. В то же время ткань, культивируемая в присутствии экстракта гипофиза, проявила более высокую гормональную активность, особенно для секреции тироксина. Наличие йодида калия в питательной среде не оказывало выраженного влияния на интенсивность секреции гормонов.

Со 2-х суток отмечается рост как базальной, так и стимулированной секреции T_3 и T_4 , при этом уровень стимулированной секреции превышал уровень базальной в среднем в 2,5 раза. Достоверных различий в уровне секреторной активности ткани, культивированной как при наличии йодида калия, так и без него не выявлено, что можно объяснить наличием резервов йодированного тиреоглобулина, за счет протеолиза которого и поддерживается адекватный уровень секреции.

С 3-х суток культивирования ткань в среде без йодида калия (культуры №1, №4) проявляет резкое снижение секреции тироксина. Более выражен данный процесс в ткани, культивируемой в присутствии экстракта гипофиза (культура №4). В то же время в динамике секреции T_3 наблюдается тенденция к некоторому ее увеличению, что может реализовываться двумя механизмами. Поскольку биологическая активность T_3 в 6 раз выше, чем T_4 , то в условиях дефицита йода включаются эволюционно сформированные адаптационные механизмы, которые переводят ткань ЩЖ в

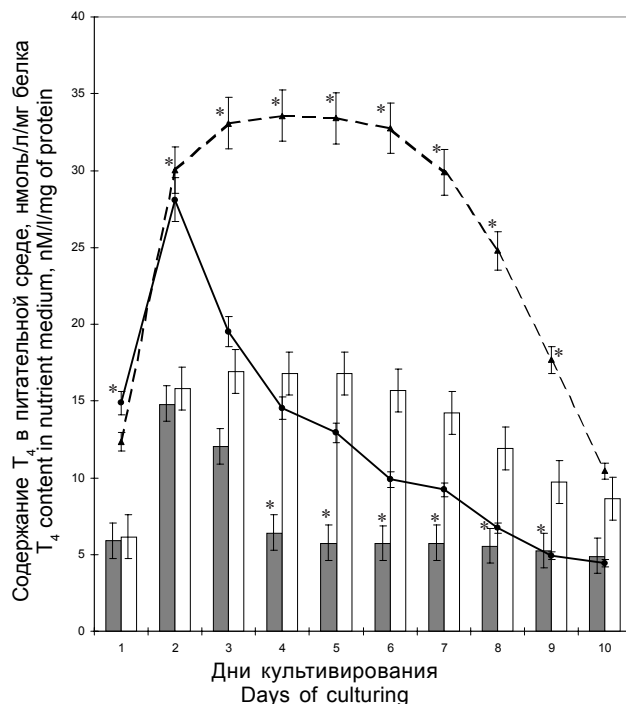


Рис. 2. Уровень секреции T_4 .
 ■ - среда 1; □ - среда 2; ▲ - среда 3; ● - среда 4.

Fig. 2. Level of T_4 secretion.
 ■ - solution 1; □ - solution 2; ▲ - solution 3; ● - solution 4.
 * - $P < 0,05$ по сравнению с базовой средой (среда 2).
 * - $P < 0.05$ in comparison with the base solution (solution 2).

and true differences in the level of secretory activity of tissue, cultured both at the potassium iodide presence and absence were revealed, that could be explained by the presence of stocks of iodinated thyroglobulin, due to the proteolysis of which the adequate level of secretion was maintained.

Starting from the 3rd day of culturing the tissue in the medium without potassium iodide (cultures 1, 4) manifests a sharp decrease in thyroxin secretion. This process in more manifested in the tissue, cultured at the hypophysis extract presence (culture 4). At the same time in the dynamics of T_3 secretion the tendency to its certain increase is observed, that can be realised by means of two mechanisms. Since the T_3 biological activity is in 6 times higher than T_4 , under conditions of iodine deficiency there is the triggering of the evolutionarily formed adaptation mechanisms, shifting the ThG tissue to the "economic" regimen of functioning, due to an increase in triiodothyronine in respect of thyroxin.

One more mechanism, related to our observation, is described. During an organ culturing along with proliferation processes, there are those of thyrocytes' dedifferentiation and follicular structure degradation of ThG tissue, manifesting in thyroid epithelium desquamation from basal membrane, appearance of disorganised accumulations of thyrocytes, which, however, keep their hormonopoietic activity, but in a slightly unnatural form, that is manifested in T_3 fraction

“экономичный” режим функционирования за счет увеличения синтеза трийодтиронина относительно тироксина.

Описан еще один механизм, который может иметь место применительно к нашему наблюдению. В процессе органного культивирования, наряду с процессами пролиферации, происходят процессы дедифференцировки тироцитов и деградации фолликулярного строения ткани ЩЖ, выражающиеся в десквамации тиреоидного эпителия с базальной мембраны, появлении дезорганизованных скоплений тироцитов, которые, однако, сохраняют свою гормонопоэтическую активность, хотя и в несколько извращенной форме, что выражается в преобладании синтеза фракции T_3 над T_4 [4]. Однако мы считаем, что данный механизм характерен для более поздних сроков культивирования, что подтверждается дальнейшим увеличением секреторной активности как для T_3 , так и T_4 в культурах, инкубируемых в средах, содержащих йодид калия (культуры №2 и №3).

К 4-м суткам культивирования мы отмечали снижение содержания в среде культивирования как T_4 , так и T_3 в средах, не содержащих йодид калия (культуры №1 и №4). При этом следует указать, что наиболее выраженная динамика снижения секреции наблюдалась в среде без йодида калия, но содержащей экстракт гипофиза (культура №4). Регресс секреции за 24 ч составил 25% для T_3 и 20% для T_4 , что, по-видимому, обусловлено быстрым исчерпанием резервов интрацеллюлярного йодида и йодированного тиреоглобулина под действием тиреотропного гормона (ТТГ). И если для базовой среды (культура №1) изменений в уровне секреции T_3 по сравнению с предыдущими сутками не наблюдалось, то для секреции T_4 было отмечено ее снижение на 45%, что может быть следствием развивающегося дефицита йодида, однако не такого выраженного, как в культуре №3, что позволяет тироцитам поддерживать на прежнем уровне секрецию трийодтиронина.

Культура №3 продемонстрировала наивысший уровень секреторной активности как по T_3 , так и T_4 , при этом динамики изменений показателей за период с 3-х по 4-е сутки не наблюдалось. К 5-м суткам она сохраняет неизменным прежний высокий уровень секреций T_3 и T_4 .

В культурах №1, №2, №4 с 5-х суток до окончания срока наблюдения прослеживается тенденция снижения уровня секреции как T_3 , так и T_4 , при этом более выражена динамика снижения T_4 по сравнению с T_3 , в результате чего изменяется соотношение между фракциями T_4 и T_3 в сторону увеличения относительного содержания T_3 , что может быть обусловлено началом дегенеративного процесса на поздних сроках культивирования,

predominance over T_4 [4]. However we believe, that this mechanism is typical for later terms of culturing, that is confirmed by further augmentation of secretory activity for both T_3 and T_4 in the cultures, being incubated in the solution with potassium iodide (cultures 2 and 3).

By the 4th day of culturing we observed a decrease in both T_3 and T_4 content in potassium iodide-free culturing solution (cultures 1 and 4). At the same time it should be noted, that the most manifested dynamics of the secretion decrease was observed in potassium iodide-free solution, but with the hypophysis extract (culture 4). The secretion regress for 24 hrs made 25% for T_3 and 20% for T_4 , that, apparently, was stipulated by a rapid exhausting of the intracellular iodide and iodinated thyroglobulin stocks under the effect of thyrotropic hormone (TTH). And if for the base solution (culture 1) no changes in the T_3 secretion level in comparison with the previous days were observed, for T_4 secretion its decrease by 45% was noted, that could result from the developing iodine deficiency, but not so manifested as for the culture 3, that allowed to thyrocytes the maintaining of triiodothyronine secretion at a previous level.

The culture 3 demonstrated the highest level of secretory activity for both T_3 and T_4 , at the same time the dynamics of the indices' changes for the period from the 3rd to 4th days was not observed. To the 5th day it keeps a previous high level of T_3 and T_4 secretion without changes.

In the cultures 1, 2, 4 from the 5th day up to the observation term finishing there is the tendency of the level decrease in both T_3 and T_4 secretion, at the same time the dynamics of T_4 decrease is more manifested in comparison with T_3 , following which there is the change in the ratio between T_4 and T_3 fractions into the side of the increase in a relative T_3 content, that can be stipulated by the degenerative process beginning at the late terms of culturing, which action mechanism was considered in the paper [4].

For the culture 3 the described above tendency starts to be traced from the 7th day of culturing, but at the same time it is characterised by a very manifested negative dynamics.

Thus, we can observe the dependence of the character of thyroid hormone secretion on the potassium iodide and hypophysis extract presence in the culturing medium, that permits to state the following: at the used by us method of culturing the hormone-production in OThGNP occurs both due to the proteolysis of deposited prior to the tissue explantation iodinated thyroglobulin and *de novo*. The highest level of thyroid hormone secretion is observed in the tissue, cultured at the potassium iodide presence from the 3rd up to 5th day for basal secretion and from the 3rd upto 6th day for stimulated one. However in the culture,

механизм действия которого был рассмотрен в [4].

Для культуры №3 описанная выше тенденция начинает прослеживаться с 7-х суток культивирования, однако при этом она характеризуется очень выраженной отрицательной динамикой.

Таким образом, можно наблюдать зависимость характера секреции тиреоидных гормонов от присутствия в среде культивирования йодида калия и экстракта гипофиза, что позволяет утверждать: при используемом нами методе культивирования гормонообразование в ОКЩЖНП происходит как за счет протеолиза депонированного до эксплантации ткани йодированного тиреоглобулина, так и *de novo*. Наиболее высокий уровень секреции тиреоидных гормонов наблюдается у ткани, культивируемой в присутствии йодида калия с 3-х по 5-е сутки для базальной секреции и с 3-х по 6-е сутки для стимулированной. Однако в культуре, инкубируемой в присутствии йодида калия и экстракта гипофиза, с 6-х суток отмечается резкое падение гормональной активности, что может быть обусловлено повреждающим действием ТТГ на ткань в условиях эксплантации. В основе данного механизма, возможно, лежит перенапряжение под влиянием ТТГ метаболических процессов в клетках ЩЖ с недостаточным адаптационно-трофическим обеспечением, следствием чего являются усиленный расход пластического и энергетического материала клеток, преобладание процессов катаболизма над восстановительными процессами. Итогом этих процессов будут дистрофия клеток и их гибель. Кроме того, с точки зрения криобиологии, данный процесс должен неблагоприятно отразиться на криоустойчивости клеток. При высокой функциональной активности клеток ЩЖ происходит активная резорбция коллоида, который, как

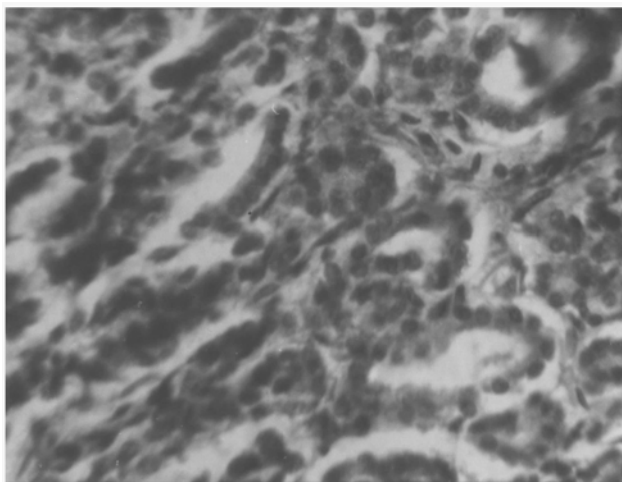


Рис. 3. Органная культура ЩЖ новорожденного поросенка на 5-е сутки культивирования ($\times 320$).

Fig. 3. Organ culture of newborn piglet's ThG to the 5th day of culturing ($\times 320$).

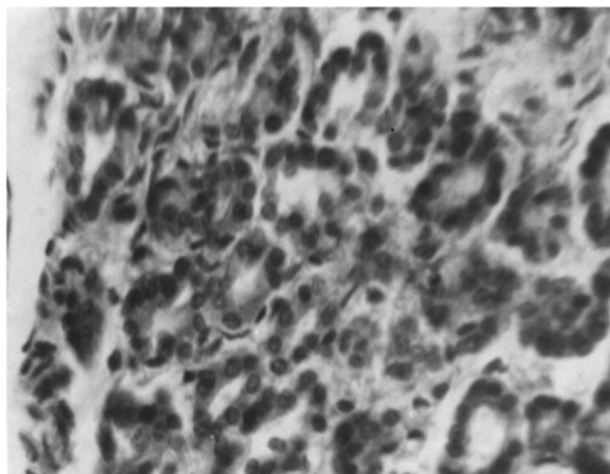


Рис. 4. Интактная ткань ЩЖ новорожденного поросенка ($\times 320$).

Fig. 4. Intact tissue of newborn piglet's ThG ($\times 320$).

being incubated at the potassium iodide and hypophysis extract presence, from the 6th day a sharp fall of hormonal activity is observed, that can be stipulated by the TTH damaging effect on tissue under explantation conditions. The overtension under TTH effect of metabolic processes in ThG cells with the insufficient adaptational and trophic providing is possibly the base for this mechanism, resulting in the strengthened expenditure of plastic and energetic cell material and the predominance of catabolism processes over recovery ones. These processes will result in cells' dystrophy and their death. In addition, from cryobiological point of view this process should unfavourably affect the cell cryoresistance. At a high functional activity of ThG cells an active colloid resorption occurs, which, as known, is a natural cryoprotectant due to its physical and chemical properties [5], therefore the colloid loss by follicles will be accompanied with a decrease in tissue cryoresistance.

The results of investigations allow to conclude, that the most adequate modus of functional activity is observed in the tissue under organ culturing conditions in potassium iodide-containing solution from the 3rd to 5th day including, that is confirmed by the performed OThGNP morphological investigations to the 5th day of culturing in the solution 2.

By the 5th day of culturing there is noted a satisfied preservation of histostructure, the signs of tissue functional tension are observed (Fig. 3). Degenerative changes to the 5th day of culturing have not a sharply marked character and are manifested by the desquamation of a certain number of cubic epithelium cells into the follicle cavity, by the activation of connective-tissue elements (Fig. 4).

Conclusions

Thus, for following cryopreservation the most

известно, является в силу своих физико-химических свойств естественным криопротектором [5], поэтому утрата фолликулами коллоида будет сопровождаться снижением криоустойчивости ткани.

Результаты исследований позволяют заключить, что наиболее адекватный модус функциональной активности наблюдается у ткани в условиях органного культивирования в среде, содержащей йодид калия с 3-х по 5-е сутки включительно, что подтверждается проведенными морфологическими исследованиями ОКЩЖНП на 5-е сутки культивирования в среде №2.

К 5-м суткам культивирования отмечается удовлетворительная сохранность гистоструктуры, наблюдаются признаки функционального напряжения ткани (рис.3). Дегенеративные изменения к 5-м суткам культивирования носят не резко выраженный характер и проявляются десквамацией некоторого числа клеток кубического эпителия в полость фолликулов, активацией соединительно-тканых элементов (рис.4).

Выводы

Таким образом, для последующего криоконсервирования наиболее приемлемо культивирование ткани ЩЖ в среде следующего состава: среда 199 с добавлением 10%-й инактивированной эмбриональной сыворотки теленка и антибиотиков (пенициллин – 100 ед/мл и канамицин – 150 ед/мл), а также 75 мкг/л йодида калия. Оптимальный срок культивирования - 5 суток.

Литература

1. *Адамс Р.* Методы культур клеток для биохимиков.– М.: Мир, 1983.– 263 с.
2. *Гаврилюк Б.К.* Органотипическое культивирование тканей.– М.: Наука, 1983.– 128 с.
3. *Грищенко В.И., Бондаренко Т.П., Луговой С.В. та ін.* Заготівля, криоконсервування та клінічне застосування органної культури щитовидної залози новонароджених поросят в лікуванні гіпотиреозів: Метод. рекомендації.– Харків, 2000.– 14 с.
4. *Надольник Л.И., Басинский В.А. и др.* Влияние условий культивирования на функциональную активность тироцитов в органной культуре щитовидной железы новорожденных поросят // Рос. физиолог. журн. им. И.М. Сеченова.– 2001.– №3 (87).– С. 375-382.
5. *Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.И. и др.* Криопротекторы.– Киев: Наук. думка, 1978.– 216 с.
6. *Шостак И.Н., Тронько Н.Д., Зурнаджи Ю.Н., Пастер И.П.* Изучение морфофункциональных свойств культивируемых тироцитов новорожденных поросят с целью определения возможности их применения для компенсации гипофункции щитовидной железы // Пробл. эндокринологии.– 1992.– Т. 38, №5.– С. 33-37.
7. *Kraiem Z., Sadeh O., Yosef M. J.* Iodide uptake and organification, triiodothyronine secretion, cyclic AMP accumulation and cell proliferation in an optimized system of human thyroid follicles cultured in collagen gel suspended in serum-free medium // Endocrinol.– 1991.– 131(3).– P. 499-506.
8. *Murphy A., Mothersill C., O'Connor M.K. et al.* An investigation of the optimum culture conditions for a differentiated culture of sheep thyroid cells //Acta Endocrinol (Copenh).– 1983.– 104(4).– P. 431-436.

Поступила 08.10.2002

suitable is the culturing of ThG tissue in the solution of following composition: medium 199 with adding the 10% inactivated calf embryonic serum and antibiotics (100 unit/ml of penicillin and 150 unit/ml for canamicin), as well as 75 mkg/l of potassium iodide. An optimal term for culturing is 5 days.

References

1. *Adams R.* Methods of cell cultures for biochemists.– Moscow: Mir.– 1983.– 263 p.
2. *Gavrilyuk B.K.* Organotypical culturing of tissues.– Moscow: Nauka, 1983.– 128 p.
3. *Grischenko V.I., Bondarenko T.P., Lugovoj S.V. et al.* Procurement, cryopreservation and clinical application of organ culture of newborn piglets' thyroid gland at hypothyrosis treatment / Method. recommendations.– Kharkov, 2000.– 14 p.
4. *Nadolnik L.I., Basinsky V.A. et al.* Effect of culturing conditions on thyrocyte's functional activity in organ culture of newborn piglets' thyroid gland//Rossijskij fiziologicheskij zhurnal imeni I.M. Sechenova.– 2001.– N3.– 87.– P. 375-382.
5. *Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M. et al.* Cryoprotectants.– Kiev: Naukova dumka, 1978.– 216 p.
6. *Shostak I.N., Tronko N.D., Zurnadzhi Yu.N., Paster I.P.* Study of morphofunctional properties of newborn piglets' cultured thyrocytes with the aim to determine the possibility of their application for compensation of thyroid gland's hypofunction // Problemy endocrinologii.– 1992.– N5.– V.38.– P. 33-37.
7. *Kraiem Z., Sadeh O., Yosef M.J.* Iodide uptake and organification, triiodothyronine secretion, cyclic AMP accumulation and cell proliferation in an optimized system of human thyroid follicles cultured in collagen gel suspension in serum-free medium.– Endocrinol.– 1991.– 131(3).– P. 499-506.
8. *Murphy A., Mothersill C., O'Connor M.K. et al.* An investigation of the optimum culture conditions for a differentiated culture of sheep thyroid cells.– Acta Endocrinol. (Copenh).– 1983.– 104(4).– P. 431-436.

Accepted in 08.10.2002