

## Модулирующее влияние глюкокортикоидов на секрецию тироксина *in vitro*

## Modulating Effect of Glucocorticoids on Thyroxine Secretion *in vitro*

Сигнально-регуляторные взаимоотношения между органами эндокринной системы лежат в основе эндокринологии, биотехнологии и молекулярной биологии. Развиваются современные технологии (клеточная и тканевая инженерия), направленные на улучшение качества морфофункциональных параметров эндокринных тканей. Комбинированное культивирование можно считать перспективным методом модуляции функциональной активности клеток различного происхождения.

Ко-культивирование тканей щитовидной и надпочечных желез может оказывать локальное влияние на трофические и сигнально-регуляторные процессы в тироцитах. Вопрос о непосредственном влиянии гормонов надпочечников на функцию тироцитов *in vitro* достаточно изучен, однако данные литературы несколько противоречивы.

Глюкокортикоиды (ГК) являются модуляторами тиреоидной функции *in vitro* и *in vivo*. Они снижают уровень тиреоглобулина в плазме крови, ингибируют процессы дейодирования гормонов [5, 6], супрессируют продукцию тиротропина [7, 9, 10], увеличивают количество рецепторов к тиреоидным гормонам и стимулируют секрецию тироксина *in vitro* [8]. Гидрокортизон усиливает захват йода и стимулирует ТТГ-секрецию в первичной культуре щитовидных желез новорожденных поросят [2]. Влияние ГК на тиреоидную функцию зависит от условий культивирования и вида животных.

Цель исследования – изучение модулирующего влияния ГК на секрецию тироксина *in vitro*.

### Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2004 г.).

Органотипические культуры щитовидных желез новорожденных поросят (ОКЩЖНП) и органо-

Signal-regulatory relations of endocrine organs are in the base of endocrinology, biotechnology and molecular biology. On the basis of these predictions the new technologies such as cell and tissue engineering designed to improve morpho-functional parameters of endocrine tissues were developed. Combined cultivation can be a new perspective approach to modulate the reproductive and functional activity of the cells of different origin.

Co-culturing of thyroid and adrenal tissues can cause some local influence on the trophical and signal-regulatory processes in thyrocytes. The problem of precise influence of adrenal cells on thyroid cells *in vitro* has not been clearly understood up till now.

The glucocorticoids (GCs) are the modulators of thyroid function *in vitro* and *in vivo*. They decrease thyreoglobulin level in blood plasma, inhibit deiodination of hormones [5, 6], suppress TSH production [7, 9, 10], increase the number of receptors to thyroid hormones and stimulate thyroxine secretion *in vitro* [8]. Hydrocortisone increases iodine-uptake and stimulates TSH-secretion in primary cultures of newborn piglets' thyroids [2]. The effect of GCs on thyroid hormonal function depends on culturing conditions and species of animals.

The goal of the research was to investigate regulatory effect of GCs on thyroxine secretion *in vitro*.

### Materials and methods

The experiments were preformed with meeting "General principles of experiments in animals", approved by the 2<sup>nd</sup> National Congress on Bioethics (Kiev, Ukraine, 2004).

Thyroid organ culture of newborn piglets (TOCNP) and thyroid organ culture of rats (TOKR) were co-cultured with adrenal tissue during 24 hours, using the semi-permeable membrane [3]. The monocultures were obtained by the standard method [1] in culturing medium (199/RPMI) with 10 % fetal bovine serum

Институт проблем криобиологии и криомедицины  
НАН Украины, г. Харьков

\* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:  
ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38  
(057) 373-30-07, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:  
cryo@online.kharkov.ua

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

\* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3007, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

типические культуры щитовидных желез крыс (ОКЩЖК) совместно культивировали с тканью надпочечников соответствующего вида животных 24 ч, используя полупроницаемую мембрану [3]. Монокультуры получали в стандартных условиях [1] на среде культивирования (199/RPMI) с 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота с добавлением пенициллина (100 ЕД/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл) в атмосфере  $\text{CO}_2$  (5%). Кроме того, культуры инкубировали при различных концентрациях кортикостерона. Уровень Т4 в среде инкубации исследовали радиоиммунологическим методом по коммерческим тест-системам (Immunotech, Чехия, РИА-Т4-СТ, Беларусь). Полученные значения нормировали на белок ткани, который определяли по методу Бредфорд [4]. Тканевые срезы моно- и комбинированных культур, окрашенные гематоксилином и эозином, исследовали под светооптическим микроскопом Olimpus.

### Результаты и обсуждение

Исследования показали, что базальный уровень Т4 в среде инкубации ОКЩЖК составлял 45,42, ОКЩЖНП – 36,29 нмоль/мг белка. После комбинированного культивирования с тканью надпочечных желез уровень Т4 для ОКЩЖК составлял 142,02, для ОКЩЖНП – около 88,05 нмоль/мг белка.

При внесении в среду инкубации ОКЩЖК кортикостерона в диапазоне концентраций от 0,25 до 1,0 мг/мл наблюдалась концентрационная зависимость тироксина от кортикостерона. Максимальная стимуляция секреции тироксина ОКЩЖНП проявлялась под воздействием физиологических концентраций кортикостерона.

На 4-е сутки культивирования в ОКЩЖНП сохранялась фолликулярная структура с признаками дистрофии (рис. 1). Отмечался отек тиреоидной ткани, который может быть связан с некротическими процессами, нарушением целостности базальных мембран и выходом содержимого фолликулов в интрафолликулярное пространство. В центральной зоне данного фрагмента наблюдалась зона некроза.

После комбинированного культивирования с надпочечниками ОКЩЖНП сохраняли фолликулярное строение по периферии фрагмента (рис. 2, а). В центральной зоне фолликулы уменьшались в размерах, расширялись межфолликулярные пространства, наблюдались скопления дезинтегрированных тироцитов (рис. 2, б). Впячивание тиреоидного эпителия в полость фолликула свидетельствует об активации интрафолликулярной пролиферации (рис. 2, а). Видны признаки десквамации тироцитов в полость фолликулов.

with adding penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) in  $\text{CO}_2$  atmosphere (5%). In addition, the cultures were incubated with different concentrations of cortico-sterone. The level of T4 in the incubation medium was measured by radioimmunoassay using the test-system (Immunotech, Czechia, RIA-T4-ST, Byelorussia). The findings were normalized on the tissue protein, which was measured by Bradford [4]. The tissue sections of mono and combined cultures of newborn piglets were stained by hematoxylin and eosin and investigated with Olympus light microscope.

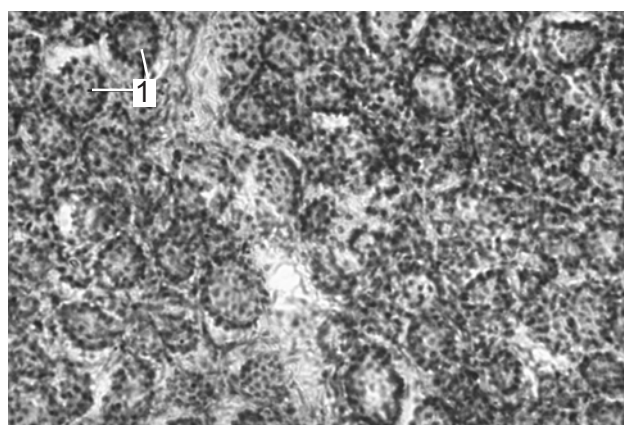
### Results and discussion

The studies show that the basal T4 level in the incubation medium of was 45.42 nmol/mg of protein. After the combined culturing with adrenal tissue T4 level for TOKR was 142.02 nmol/mg of protein and about 88.05 nmol/mg of protein for TOKNP.

The concentration dependence of thyroxin on corticosterone was observed when adding TOKR within the concentration range from 0.25 to 1.0  $\mu\text{g/ml}$  into incubation medium. The maximal stimulation of thyroxin secretion of TOKNP was detected under the effect of corticosterone physiological concentrations.

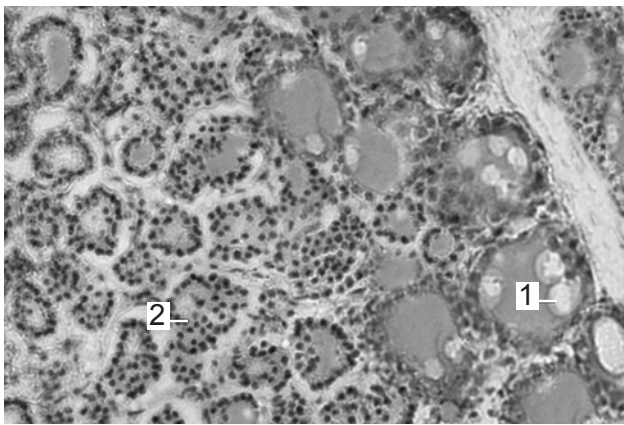
TOKNP to the 4<sup>th</sup> day of culturing was characterized with follicular structure with dystrophy signs (Fig. 1). One can see the edema of thyroid tissue, which may be associated with necrotic processes, damage of follicular epithelium of basal membranes and release of follicle contents into intrafollicular space. In the central area of the given fragment the zone of necrosis was found.

The TOKNP maintained the follicular architecture on a periphery of the fragment after a combined culturing with adrenal glands (Fig. 2, a). In central zone

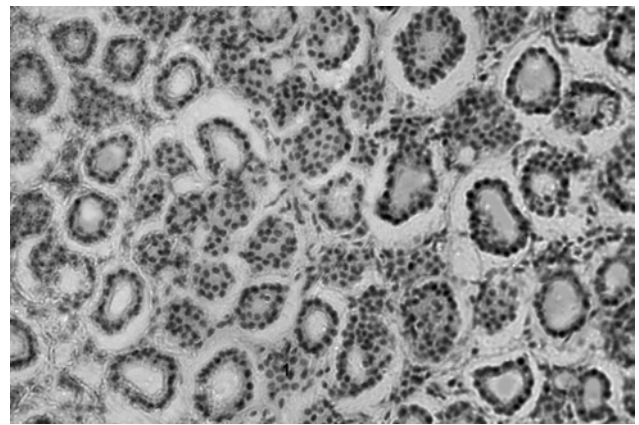


**Рис. 1.** Фрагмент ОКЩЖНП на 4-й день культивирования. Микрофолликулярное строение тиреоидной ткани. Десквамация тироцитов в полость фолликулов (1).  $\times 400$ .

**Fig. 1.** Fragment of TOKNP to the 4<sup>th</sup> day of culturing. Microfollicular structure of thyroid tissue. Desquamation of thyrocytes into the cavity of follicles (1).  $\times 400$ .



а



б

**Рис. 2.** Краевая (а) и центральная (б) зоны ОКЦЖНП после комбинированного культивирования с тканью надпочечников. Нормальная фолликулярная архитектура, вакуоли резорбции (1). Признаки интрафолликулярной регенерации (2). × 400.

**Fig. 2.** Marginal (a) and central (b) zones of TOCNP after combined culturing with adrenal tissue. Normal follicular architecture, vacuoles of resorption (1). Signs of intrafollicular regeneration (2). × 400.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о стимулирующем эффекте ГК и комбинированного культивирования ткани щитовидных и надпочечных желез на гормональную активность и гистологические параметры органотипических культур щитовидных желез крыс и новорожденных поросят.

the follicles reduced in dimensions, interfollicular spaces extended, the accumulations of disintegrated thyrocytes (Fig 2, b) were observed. Invagination of thyroid epithelium into the follicular cavity testifies to the activation of intrafollicular proliferation (Fig 2, a). The desquamation signs of thyrocytes into the follicular cavity are found.

Thus, our results show the stimulating effect of GCs and combined co-culturing of thyroid and adrenal tissues on hormonal activity and histological parameters of TOKR and TOKNP.

### Литература

1. Турчин І.С., Комісаренко І.В., Тронько М.Д. та інш. Трансплантація культур клітин і тканин щитовидної залози при гіпотиреозі: Метод. рекомендації.— Київ, 1997.— 15 с.
2. Becks G.P., Buckingham D.K., Wang J.P. et al. Regulation of thyroid hormone synthesis in cultured bovine thyroid follicles // *Endocrinology*.— 1992.— Vol. 130, N5.— P. 2789–2794.
3. Bilyavskaya S.B., Legach E.I., Bozhok G.A., Bondarenko T.P. Result of experimental hypothyroidism correction by combined transplantation of organ cultures // *Eur. J. Med. Res.*— 2007.— Vol. 12.— P. 45.
4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*— 1976.— Vol. 72.— P. 248–254.
5. Chopra I.J., Williams D.E., Orgiazzi J., Solomon D.H. Opposite effects of dexamethasone on serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3) and 3,3',5'-triiodothyronine (T3) // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*— 1975.— Vol. 41, N5.— P. 911–920.
6. Duick D.S., Warren D.W., Nicoloff J.T. et al. Effect of a single dose of dexamethasone on the concentration of serum triiodothyronine in man // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*— 1974.— Vol. 39, N6.— P. 1151–1154.
7. Dussault J.H. The effect of dexamethasone on TSH and prolactin secretion after TRH stimulation // *Can. Med. Assoc. J.*— 1974.— Vol. 111, N11.— P. 1195–1197.
8. Oppenheimer J.H., Werner S.C. Effect of prednisone on thyroxine-binding proteins // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*— 1966.— Vol. 26, N7.— P. 715–721.
9. Otsuki M., Dakoda M., Baba S. Influence of glucocorticoids on TRF-induced TSH response in man // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*— 1973.— Vol. 36, N1.— P. 95–102.

### References

1. Turchin I.S., Komisarenko I.V., Tron'ko M.D. et al. Transplantation of cell and tissue thyroid cultures at hypothyroidism: Method. Rec.— Kiev, 1997.— 15 p.
2. Becks G.P., Buckingham D.K., Wang J.P. et al. Regulation of thyroid hormone synthesis in cultured bovine thyroid follicles // *Endocrinology*.— 1992.— Vol. 130, N5.— P. 2789–2794.
3. Bilyavskaya S.B., Legach E.I., Bozhok G.A., Bondarenko T.P. Result of experimental hypothyroidism correction by combined transplantation of organ cultures // *European J. of Medical Research*.— 2007.— Vol. 12.— P. 45.
4. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal. Biochem.*— 1976.— Vol. 72.— P. 248–254.
5. Chopra I.J., Williams D.E., Orgiazzi J., Solomon D.H. Opposite effects of dexamethasone on serum concentrations of 3,3',5'-triiodothyronine (reverse T3) and 3,3',5'-triiodothyronine (T3) // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*— 1975.— Vol. 41, N5.— P. 911–920.
6. Duick D.S., Warren D.W., Nicoloff J.T. et al. Effect of a single dose of dexamethasone on the concentration of serum triiodothyronine in man // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*— 1974.— Vol. 39, N6.— P. 1151–1154.
7. Dussault J.H. The effect of dexamethasone on TSH and prolactin secretion after TRH stimulation // *Can. Med. Assoc. J.*— 1974.— Vol. 111, N11.— P. 1195–1197.

10. *Re R.N., Kourides I.A., Ridgway E.C. et al.* The effect of glucocorticoid administration on human pituitary secretion of thyrotropin and prolactin // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*– 1976.– Vol. 43, N2.– P. 338–346.

*Поступила 13.05.2008*

8. *Oppenheimer J.H., Werner S.C.* Effect of prednisone on thyroxine-binding proteins // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*– 1966.– Vol. 26, N7.– P. 715–721.

9. *Otsuki M., Dakoda M., Baba S.* Influence of glucocorticoids on TRF-induced TSH response in man // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*– 1973.– Vol. 36, N1. – P. 95–102.

10. *Re R.N., Kourides I.A., Ridgway E.C. et al.* The effect of glucocorticoid administration on human pituitary secretion of thyrotropin and prolactin // *J. Clin. Endocrinol. Metab.*– 1976.– Vol. 43, N2.– P. 338–346.

*Accepted in 13.05.2008*