

Влияние скорости охлаждения в различных температурных интервалах на сохранность стероидогенного потенциала суспензии интерстициальных клеток семенников взрослых крыс

UDC 57.043:591.463.2.085

T.M. GURINA, A.V. PAKHOMOV*, G.A. BOZHOK

Effect of Cooling Rate under Various Temperature Intervals on Survival of Steroidogenic Potential of Suspension of Interstitial Cells of Adult Rat's Testes

Исследовано влияние условий криоконсервирования (концентрация криопротектора, инкубация клеток с криопротектором перед замораживанием, скорости охлаждения образцов в различных температурных интервалах) на сохранность стероидогенных клеток в суспензии клеток интерстиция (СКИ) тестисов. Результатом этого явилась разработка режима криоконсервирования СКИ, который дает наилучшую сохранность и функциональную активность стероидогенных клеток по сравнению с уже существующими режимами для биологического материала тестисов.

Ключевые слова: тестостерон, клетки Лейдига, скорость замораживания, 3 β -гидроксистероиддегидрогеназа, переохлаждение.

Досліджено вплив умов кріоконсервування (концентрація кріопротектора, інкубація клітин з кріопротектором перед заморожуванням, швидкості охолодження зразків в різних температурних інтервалах) на збереженість стероїдогенних клітин в суспензії клітин інтерстицію (СКИ) тестисів. Результатом цього була розробка режиму кріоконсервування СКИ, який дає найкращу збереженість і функціональну активність стероїдогенних клітин порівняно з режимами, які вже існують для біологічного матеріалу тестисів.

Ключові слова: тестостерон, клітини Лейдига, швидкість охолодження, 3 β -гидроксистероїддегідрогеназа, переохолодження.

The effect of cryopreservation conditions (cryoprotectant concentration, cell incubation with cryoprotectants prior to freezing, cooling of samples with various temperature intervals) on survival of steroidogenic cells in the testicular interstitium cell suspension (ICS) has been investigated. This resulted in designing of cryopreservation protocol for ICS, which provided the highest survival and functional activity of steroidogenic cells if compared with the protocols already existing for testicular biological material.

Key-words: testosterone, Leydig cells, cooling rate, 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase, overcooling.

Трансплантация биологического материала мужских половых желез, ответственных за синтез андрогенов, при коррекции различных заболеваний, приводящих к гормональной недостаточности, широко распространяется в настоящее время. Согласно статистике ежегодно наблюдается тенденция к увеличению количества заболеваний, связанных с недостаточной выработкой тестостерона [7].

На сегодняшний день известны экспериментальные модели по трансплантации целых тестисов, их фрагментов и органотипических культур, а также изолированных клеток Лейдига для компенсации гипогонадизма [2, 6]. Однако для эффективного использования метода трансплантации необходимо создать банк полноценного донорского материала, который обеспечил бы его долгосрочное хранение. Кробиология в этом отношении открывает широкие перспективы. Существует ряд способов криоконсервирования тестикулярных тканей и клеток с использованием криопротекторов

Transplantation of biological material of male sexual glands responsible for the synthesis of androgens when correcting different diseases, resulting in hormonal insufficiency, is widely spread nowadays. According to the statistics annually the tendency to a rise of the number of diseases associated to insufficient production of testosterone [7] is observed.

Up today there are known experimental models on transplantation of the whole testes, their fragments and organotypic cultures as well as of isolated Leydig cells for compensation of hypogonadism [2, 6]. However for efficient use of transplantation method it is necessary to establish the bank of valuable donor's material, which will provide its long-term storage. There are some cryopreservation protocols of testicular tissue and cells using cryoprotectants: dimethyl sulfoxide (DMSO), 1-2-propanediol, ethylene glycol, glycerol with relatively low cooling rate of the samples (1-2°C/min) [10, 12, 14]. However they are related to significant reduction of viability and functional activity

Институт проблем кробиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

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

* 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

* 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

диметилсульфоксида (ДМСО), 1,2-пропандиола, этиленгликоля, глицерина с относительно низкой скоростью охлаждения образцов (1-2°C/мин) [10, 12, 14]. Однако они связаны со значительным снижением жизнеспособности и функциональной активности материала семенников. Так как одним из важнейших результатов криоконсервирования семенников является сохранность тестостеронпродуцирующих клеток Лейдига, необходимы исследования, направленные на изучение влияния отдельных факторов криоконсервирования на сохранность стероидогенных клеток, их функциональной способности и разработку режима, позволяющего максимально сохранить гормонопродуцирующую составляющую тестисов.

Цель работы – исследовать влияние скорости охлаждения в температурном интервале кристаллизации биологической системы и диапазоне субэвтектических температур раствора криопротектора ДМСО, применяемого в качестве криопротектора, на общую сохранность суспензии клеток интерстиция (СКИ) семенников и на сохранность отдельной популяции клеток в СКИ, обладающей высокой активностью 3 β -гидроксистероиддегидрогеназы (ГСД(+)-клеток). Фермент 3 β -ГСД играет одну из ключевых ролей в реакциях превращения холестерина в тестостерон. Он является маркером тестостеронпродуцирующих клеток Лейдига в тестисах. Было исследовано влияние скоростей охлаждения в различных температурных интервалах на изменение базальной и стимулированной секреции тестостерона интерстициальными клетками.

На основе полученных данных предпринята попытка создать наиболее оптимальный режим криоконсервирования СКИ, учитывающий зависимость сохранности тестостеронпродуцирующих клеток от скорости охлаждения в различных температурных интервалах.

Материалы и методы

Эксперименты проведены в соответствии с «Общими принципами экспериментов на животных», одобренными I Национальным конгрессом по биоэтике (20.09.01 г., Киев, Украина) и согласованными с положениями «Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1985).

Суспензии клеток интерстиция семенников взрослых крыс получали следующим образом. После экстирпации семенники освобождали от оболочки, подвергали мягкой обработке коллагеназой (4 мг/мл) на среде 199 с 20 мМ Hepes (pH 7,4) при 32–34°C и непрерывном помешивании на протяжении 15 мин. Перед разделением полу-

of testes material. Since one of the most important cryo-preservation results for testes is the survival of testosterone-producing Leydig cells, there is a need in the studies directed to investigation of the effect of certain factors of cryopreservation on survival of steroidogenic cells, their functional ability and the designing of the regimen enabling to maximally preserve hormone-producing component of testes.

The research aim was to study the effect of cooling rate within temperature interval of crystallization of biological system and within the range of sub-eutectic temperatures of the solution of DMSO, applied as cryoprotectants on total survival of interstitium cell suspension (ICS) of testes and the survival of separate cell population in ICS, having a high activity of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (HSD(+)-cells). Enzyme 3 β -HSD plays one of key roles in transformation reactions of cholesterol into testosterone. It is the marker of testosterone-producing Leydig cells in testes. The effect of cooling rates within various temperature intervals on the change of basal and stimulated secretion of testosterone by interstitial cells has been studied.

With basing on the obtained results there was the attempts to create the most optimal regimen of cryopreservation for ICS, taking into account the dependence of testosterone-producing cells on the cooling rate within different temperature intervals.

Materials and methods

The experiments were performed in accordance with “General principles of the experiments in animals”, adopted by the 1st National Congress on Bioethics (20.09.01, Kyiv, Ukraine) and coordinated with the statements of “European Convention on the protection of vertebrate animals, used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 1985).

Cell suspensions of testes interstitium of adult rats were obtained as follows. After extirpation the testes were de-coated and subjected to a mild treatment with collagenase (4 mg/ml) in medium 199 with 20mM Hepes (pH 7.4) at 32–34°C and constant mixing for 15 min. Prior to separation of the resulted cell suspension in density gradients of sucrose a primary sedimentation of tubular structures was performed. After its separation the cell fraction with the density of 1.127–1.176 g/cm³ was washed-out by medium 199 with 20 mM Hepes (pH 7.4). The obtained cells were used in experiments.

ICS were cryopreserved with DMSO cryoprotectant under final concentration of 10%. DMSO solution was prepared in medium 199 with 20 mM Hepes and added to cells in 1:1 ratio. The volume of the sample to be frozen is 1 ml.

After adding the cryoprotectant solution the samples were frozen with programmable freezer (Cryoson,

ченной суспензии клеток в градиентах плотности сахарозы осуществляли первичное осаждение тубулярных структур. После ее разделения фракция клеток плотностью 1,127–1,176 г/см³ была отмыта средой 199 с 20 мМ Hepes (pH 7,4). Полученные клетки использовали в экспериментах.

Криоконсервирование СКИ проводили с криопротектором ДМСО в конечной концентрации 10%. Раствор ДМСО готовили на среде 199 с 20 мМ Hepes и добавляли к клеткам в соотношении 1:1. Объем замораживаемого образца составлял 1 мл.

После добавления раствора криопротектора образцы замораживали на программном замораживателе «Cryoson» (Германия) в криоампулах (фирма «Nunc») объемом 1,8 мл. Регистрацию программы замораживания проводили при помощи установленной в криоампулах медь-константановой термодопы и самописца типа «Endim» 622.01.

При исследовании влияния скоростей охлаждения образцов в температурном интервале кристаллизации криобиологической системы на общую сохранность СКИ и сохранность популяции ГСД⁺-клеток использовали следующие программы.

Программа 1: образцы охлаждали от 20–22 до –40°C с постоянной скоростью 1–2°C/мин и последующим их погружением в жидкий азот. Скорость, используемая для замораживания в данной программе, рекомендована для клеток Лейдига [10, 14].

Программа 2: образцы охлаждали аналогично программе 1, но дополнительно вводили процедуру программного снятия переохлаждения путем температурной инициации кристаллообразования, предусмотренную возможностями замораживателя «Cryoson».

Программа 3: образцы охлаждали от 20–22°C со скоростью 1°C/мин, однако после программного снятия переохлаждения скорость охлаждения в интервале температур кристаллизации биологической системы увеличивали до 15–20°C/мин. После достижения температуры –40°C образцы погружали в жидкий азот. При реализации программ замораживания с температурной инициацией кристаллообразования величина переохлаждения не превышала 0,5–1°C.

При исследовании влияния скорости охлаждения образцов в диапазоне температур от –40 до –70°C, в который входит точка эвтектики растворов ДМСО (66,7°C), на общую сохранность СКИ, сохранность ГСД⁺-клеток, а также на способность СКИ к синтезу и секреции тестостерона, использовали следующие программы:

Программа 4: образцы охлаждали от 20–22 до –40°C с постоянной скоростью 1–2°C/мин. В

Германия) в 1.8 ml cryovials (Nunc). Freezing programs were recorded with adjusted on cryovials copper-constantan thermocouple and “Endim” 622.01 recorder.

When studying the effect of cooling rates within temperature interval of cryobiological system crystallization on total integrity of ICS and the survival of population of HSD⁺-cells the following programs were used:

Program 1: the samples were cooled from 20–22°C down to –40°C with constant rate of 1–2°C/min and following their submerging into liquid nitrogen. The rate used for freezing in this program is recommended for Leydig cells [10, 14].

Program 2: the samples were cooled the same as for Program 1, but additionally the procedure of programmable withdrawal of overcooling by means of temperature initiation of crystal formation, foreseen by the “Cryoson” freezer resources was introduced.

Program 3: the samples were cooled from 20–22°C with the rate of 1°C/min, however after programmable withdrawal of overcooling the cooling rate within temperature interval of biological system crystallization increased up to 15–20°C/min. After achieving the temperature of –40°C the samples were submerged into liquid nitrogen. When realizing the freezing programs with temperature initiation of crystal formation the overcooling value did not exceed 0.5–1°C.

When investigating the effect of cooling rate of the samples within the temperature range from –40 down to –70°C, wherein the eutectics point of DMSO solutions (66.7°C) is also comprised, on total survival of ICS, that of HSD⁺-cells as well as the ability of ICS to synthesize and secrete testosterone, the following programs were used:

Program 4: the samples were cooled from 20–22 down to –40°C with constant rate of 1–2°C/min. Within the range of temperatures from –40 down to –70°C there was preserved the same cooling rate (1°C/min). After reaching the temperature of –70°C the samples were immersed into liquid nitrogen.

Program 5: the samples were cooled from 20–22 down to –40°C with the rate of 1–2°C/min. Within the range of temperatures from –40 down to –70°C the cooling rate was increased up to 20–25°C/min. Afterwards the samples were immersed into liquid nitrogen.

When creating the most optimal cryopreservation regimen (Program 6) the dependence of ICS integrity and that of HSD⁺-cells on cooling rate within different temperature intervals was taken into account, wherefore the results on cryopreservation of samples according to programs 2 and 3 were compared with those obtained when using program 1, and for programs 4 and 5 this was done by comparing them with each other and program 1. Distinctive feature of the program 1 is rapid non-controlled cooling of the samples when

диапазоне температур от -40 до -70°C сохраняли ту же скорость охлаждения $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. После достижения температуры -70°C образцы погружали в жидкий азот.

Программа 5: образцы охлаждали от $20-22$ до -40°C со скоростью $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. В диапазоне температур $-40...-70^{\circ}\text{C}$ скорость охлаждения увеличивали до $20-25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. После этого образцы погружали в жидкий азот.

При создании наиболее оптимального режима криоконсервирования (программа 6) учитывали зависимость сохранности СКИ и ГСД⁺-клеток от скорости охлаждения в различных температурных интервалах, для чего результаты по криоконсервированию образцов согласно программам 2 и 3 сравнивали с результатами, полученными при использовании программы 1, а программ 4 и 5 – между собой и с результатами программы 1. Отличительной особенностью программы 1 является быстрое неконтролируемое охлаждение образцов при погружении в жидкий азот в диапазоне температур от -40°C и ниже.

Программа 6: образцы охлаждали от $20-22^{\circ}\text{C}$ со скоростью $1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. После программного снятия переохлаждения скорость охлаждения в интервале температур кристаллизации биологической системы (до -40°C) увеличивали до $15-20^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, а в диапазоне температур от -40 до -70°C – до $20-25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$.

Образцы отогревали на водяной бане ($32-34^{\circ}\text{C}$), отмывали от ДМСО путем постепенного снижения его концентрации в среде.

Базальную и стимулированную секрецию клеток исследовали при помощи инкубации клеток в среде 199 с 20 мМ HEPES в течение часа при $32-34^{\circ}\text{C}$. Как стимулятор стероидогенеза использовали хорионический гонадотропин (ХГ) в концентрации 1 МЕ/мл («Organon», Нидерланды). Содержание тестостерона в инкубационной среде измеряли радиоиммунологическим методом с использованием наборов «РИА СТ-тестостерон» (Беларусь) и рассчитывали на количество клеток до замораживания.

Гистохимическое окрашивание на выявление активности 3β -ГСД проводили методом, описанным в [11], согласно которому $2-4 \times 10^6$ кл/мл инкубировали в 2,5 мл физиологического раствора с буфером (рН 7,4), содержащего 0,2 мг/мл нитросинего тетразолия (НСТ), 1 мг/мл НАД («Sigma») и 0,12 мг/мл дегидроэпиандростерона («Sigma») в течение 90 мин при $32-34^{\circ}\text{C}$. Позитивно окрашенные клетки имели светло-фиолетовую окраску. Подсчет ГСД⁺-клеток осуществляли в поле зрения микроскопа.

Сохранность клеток контролировали методом суправитального окрашивания трипановым синим [8]. Общую сохранность клеток после криоконсер-

submerging into liquid nitrogen within the temperature range from -40°C and lower.

Program 6: the samples were cooled from $20-22$ down to -40°C with the rate of $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. After programmable withdrawal of overcooling the cooling rate within the temperature interval of biological system crystallization (down to -40°C) was increased up to $15-20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ and within the temperature range from -40 down to -70°C up to $20-25^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

The samples were thawed on water bath ($32-34^{\circ}\text{C}$), washed-out from DMSO by gradual reduction of its concentration in the medium.

Basal and stimulated secretions of cells were examined using cell incubation in the medium 199 with 20 mM HEPES for an hour at $32-34^{\circ}\text{C}$. Chorionic gonadotropin (CG) in concentration of 1 IU/ml (Organon, the Netherlands) was used as the stimulator of steroidogenesis. Testosterone content in incubation medium was measured by radio immunologic method using the kits «RIA ST-testosterone» (Belarus) and counted in respect of the number of cells prior to freezing.

Histochemical staining for revealing the activity of 3β -HSD was done by the described method [11] according to that $2-4 \times 10^6$ cells/ml were incubated in 2.5 ml of buffered physiological solution (pH 7.4), containing 0.2 mg/ml of nitroblue tetrasolium (NBT), 1mg/ml NAD (Sigma) and 0.12 mg/ml dehydroepiandrosterone (Sigma) for 90 min at $32-34^{\circ}\text{C}$. Positively stained cells were light violet. HSD⁺-cells were counted within microscope vision field.

Cell survival was controlled with the method of supravital staining with trypan blue [8]. Total cell survival after cryopreservation with different freezing protocols was expressed in percentage to interstitium cells prior to freezing, the survival of HSD⁺-cells after cryopreservation was found on the ratio to the number of HSD⁺-cells in the samples prior to freezing.

For statistical processing of the results single-factor analysis of variance and Student's t -criterion was used by means of Excel software.

Results and discussion

Cryopreservation factor affects significantly ICS integrity. So, the total number of cells of interstitium cryopreserved according to program 1, sharply reduced down to 55% (Fig. 1) and down to 30% for HSD⁺-cells. The ability for synthesis and secretion of testosterone at cooling rate of $1-2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ down to -40°C with following submersion of the samples into liquid nitrogen was decreased. As Fig 2. shows the use of this cooling rate results in a significant reduction of basal and stimulated by CG of ICS steroidogenesis. Especially sharp reduction of their ability to respond to tropic stimulation was found.

During freezing the conditions and rate of crystal-like structure formation significantly affect the survival

вирования по различным программам замораживания выражали в процентном отношении к клеткам интерстиция до замораживания, сохранность ГСД⁺-клеток после криоконсервирования – по отношению к количеству ГСД⁺-клеток в образцах до замораживания.

При статистической обработке результатов использовали однофакторный дисперсионный анализ и t-критерий Стьюдента с помощью пакета программ Excel.

Результаты и обсуждение

Фактор криоконсервирования значительно влияет на сохранность СКИ. Так, общее количество клеток интерстиция, криоконсервированных согласно программе 1, резко снижалось до 55% (рис. 1), а ГСД⁺-клеток – до 30%. Способность к синтезу и секреции тестостерона при скорости охлаждения 1–2°С/мин до –40°С, с дальнейшим погружением образцов в жидкий азот, была снижена. Как показано на рис. 2, использование данной скорости охлаждения приводит к значительному снижению базального и стимулированного ХГ стероидогенеза СКИ. Особенно резко уменьшалась их способность отвечать на тропную стимуляцию ХГ.

На сохранность клеточных суспензий при замораживании существенно влияют условия и скорость образования кристаллообразной структуры [1, 3, 9]. Конечный результат кристаллизации будет определяться взаимосвязью скорости появления новых центров кристаллизации и скорости роста образовавшихся кристаллов. Каждый из этих факторов может по-разному влиять на сохранность тех или иных клеток в клеточной суспензии.

Уменьшение величины переохлаждения способствует увеличению сохранности различных клеток после замораживания [5].

При исследовании сохранности клеток в температурном интервале кристаллизации системы было показано, что программное снятие переохлаждения образцов при замораживании СКИ (программа 2) приводило к увеличению общей сохранности клеток до 64% и сохранности ГСД⁺-клеток до 47% от нативных ГСД⁺-клеток (см. рис. 1). При этом увеличение скорости охлаждения после программного снятия переохлаждения (программа 3) значительно повышало сохранность популяции ГСД⁺-клеток (см. рис. 1). Способность к синтезу и секреции тестостерона СКИ, особенно в ответ на стимуляцию ХГ, также увеличивалась (рис. 2) по сравнению со способностью клеток, криоконсервированных по программе 1.

Эти результаты свидетельствуют о преимуществе использования после снятия переохлаж-

of cell suspensions [1, 3, 9]. Final result of crystallization will be determined by interaction of the rate of new crystallization centers' appearance and growth rate of the formed crystals. Each of these factors may differently affect the integrity of any cells in cell suspension.

Reduction of overcooling value contributes to a rise in survival of different cells after freezing [5].

When investigating the cell integrity within the temperature interval of system crystallization there was shown that programmable withdrawal of overcooling of the samples during ICS freezing (program 2) resulted in an increases total integrity of cells up to 64% and that for HSD⁺-cells up to 47% from native HSD⁺-cells (see Fig. 1). Herewith a rise in the cooling rate after programmable withdrawal of overcooling (program 3) considerably increased the survival of HSD⁺-cells population (see Fig. 1). The ability for synthesis and secretion of ICS testosterone by ICS especially the response to CG stimulation also enhanced (Fig. 2) if compared with the ability of the cells cryopreserved on program 1.

These results testify to the advantage of using after overcooling withdrawal higher freezing rates at the stage of biological system crystallization. In addition, maximum reduction of overcooling which frequently determines the further character of system crystallization and rate of re-crystallization processes at thawing stage will positively affect the survival of steroidogenic testes cells.

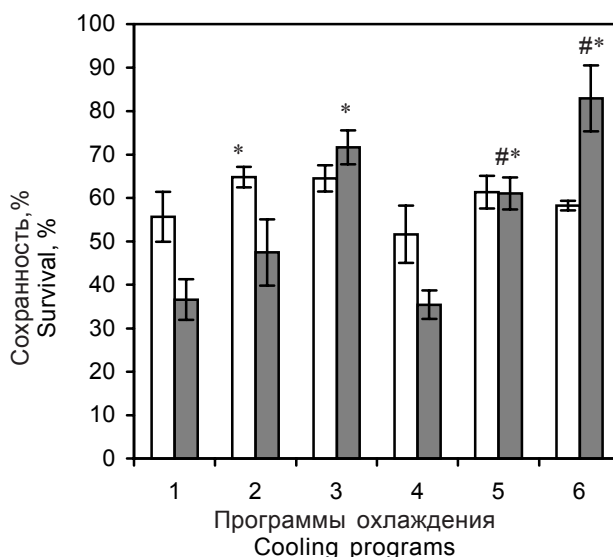


Рис. 1. Общая сохранность (□) и сохранность ГСД⁺-клеток в СКИ (■) при различных программах замораживания; * – различия достоверны по отношению к программе 1; # – различия достоверны по отношению к программе 4 (p<0,05).

Fig. 1. Total survival (□) and that for HSD⁺-cells in ICS (■) at different freezing programs. * – differences are statistically significant in respect of the program 1; # – differences are statistically significant in respect of the program 4 (p<0.05).

дения более высоких скоростей замораживания на этапе кристаллизации биологической системы. Кроме того, максимальное снижение переохлаждения, которое зачастую определяет дальнейший характер кристаллизации системы и скорость рекристаллизационных процессов на этапе отогрева, будет позитивно сказываться на сохранности стероидогенных клеток семенников.

Исследовано явление низкотемпературного эвтектического расслоения растворов криопротекторов [4, 13] и значение для криоконсервирования диапазона субэвтектических температур растворов криопротекторов. Сделано допущение, что процессы, связанные со структурными изменениями образцов в данном температурном интервале, могут значительно снижать сохранность криоконсервируемых клеток. Из-за незаконченного процесса кристаллообразования в этих температурных интервалах высока вероятность различных рекристаллизационных процессов, которые могут существенно снижать сохранность клеток, особенно на этапе отогрева [1, 3]. Это ставит под сомнение эффективность быстрого неконтролируемого замораживания образцов путем погружения их в жидкий азот при достижении температуры -40°C (программы 1, 2 и 3).

Дальнейшим этапом работы было исследование общей сохранности СКИ и сохранности ГСД⁺-клеток в СКИ при охлаждении с различной скоростью в диапазоне температур от -40 до -70°C , в котором может происходить низкотемпературное эвтектическое расслоение раствора криопротектора и наиболее вероятны дальнейшие перестройки структуры межкристаллических прослоек в замораживаемой биологической системе [13].

Охлаждение в данном интервале температур с постоянной скоростью $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (программа 4) не приводило к заметному увеличению как общей клеточной сохранности (см. рис. 1), так и сохранности ГСД⁺-клеток. Содержание тестостерона в среде инкубации, как и ответ СКИ на тропную стимуляцию после замораживания по программе 4 оставались довольно низкими и сравнимы были с аналогичными показателями для клеток, криоконсервированных по программе 1 (рис. 2). Такой же результат по стероидной продукции был получен и при увеличении скорости охлаждения до $20-25^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ в интервале температур от -40 до -70°C (программа 5, рис. 2). Однако при этом возрастали общая сохранность клеток и сохранность ГСД⁺-клеток (программа 5, см. рис. 1), что свидетельствует о положительном эффекте более высоких скоростей охлаждения в данном интервале температур при криоконсервировании.

Таким образом, охлаждение в интервале температур от -40 до -70°C при замораживании СКИ

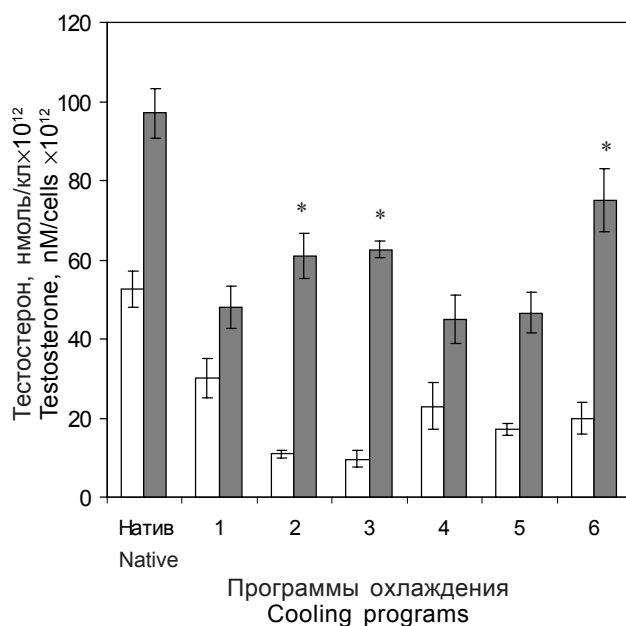


Рис. 2. Базальная (□) и стимулированная секреция (■) тестостерона СКИ после различных программ охлаждения. * – различия достоверны по отношению к программе 1 ($p < 0,05$).

Fig. 2. Basal (□) and stimulated (■) secretions of ICS testosterone after different cooling programs. * – differences are statistically significant in respect of the program 1 ($p < 0.05$).

Low-temperature eutectic stratification of cryoprotectant's solutions [4, 13] and the values for cryopreservation of the range of sub-eutectic temperatures of cryoprotectants solutions have been shown. It was assumed that the processes related to structural changes of samples within this temperature interval may significantly reduce the survival of the cells under cryopreservation. Due to formation of incompleting ice crystals within these temperature intervals the probability of different recrystallization processes capable to reduce the cell survival especially at thawing stage is quite high [1, 3]. This fact prejudices the efficiency of rapid non-controlled freezing of the samples by submerging them into liquid nitrogen when reaching the temperature of -40°C (programs 1, 2 and 3).

The following research stage there was the study of total survival of ICS during cooling with various rate within the temperature range from -40 down to -70°C wherein low-temperature eutectic stratification of cryoprotectant solution may occur and further rearrangements of the structure of intercrystal interlayers in the biological system under freezing are very probable [13].

Cooling within this temperature interval with constant rate of $1-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ (program 4) did not result in marked rise in both total cell survival (see Fig. 1) and that for HSD⁺-cells. Content of testosterone in incubation medium as well as a response of ICS on tropic stimulation after freezing on program 4 have remained quite low and were comparable with the same

должно происходить с определенной скоростью (20–25°C/мин), не допуская быстрого неконтролируемого охлаждения погружением образца в жидкий азот после достижения температуры –40°C (программа 1).

Эффект увеличения показателей сохранности клеток при использовании относительно быстрых скоростей охлаждения (15–20°C/мин) после снятия переохлаждения при охлаждении до температуры –40°C (программа 3) был выше, чем при увеличении скорости охлаждения в температурном интервале –40...–70°C (программа 5).

Следует обратить внимание, что охлаждение образцов в программах 4 и 5 до –40°C проводили одинаково с постоянной скоростью 1–2°C/мин для того, чтобы выделить зависимость сохранности клеток только от охлаждения в субэвтектическом интервале температур. При этом отсутствие значительного увеличения синтеза и секреции тестостерона, особенно в ответ на стимуляцию ХГ, при использовании программ 4 и 5 еще раз подтверждает несостоятельность использования медленных скоростей охлаждения именно на этапах кристаллизации биологической системы (до –40°C). Однако увеличение сохранности ГСД⁺-клеток при использовании программы 5 свидетельствует о необходимости контроля скоростей на этапах охлаждения ниже –40°C, когда происходит дальнейшее достраивание кристаллических структур.

Учитывая вышеописанное влияние скоростей охлаждения на различных этапах криоконсервирования на сохранность и стероидогенный потенциал СКИ взрослых крыс, уместно было разработать новый режим криоконсервирования. При дальнейшей работе с СКИ использовали программу 6, которая включала программное снятие переохлаждения, быстрое, по сравнению с программой 1, охлаждение образцов в температурном интервале кристаллизации биологической системы и быстрое, по сравнению с программой 4, замораживание в диапазоне субэвтектических температур растворов ДМСО.

При использовании программы 6 получена наибольшая сохранность ГСД⁺-клеток – 83% (рис. 1), которые ответственны за продукцию андрогенов. Клетки интерстиция после использования данной программы замораживания обладали наибольшей способностью как к базальному, так и к стимулированному синтезу тестостерона (рис. 2). Уровень тестостерона в среде инкубации после стимуляции ХГ был (75±6) нмоль/кл×10¹², что составляет около 70% от контроля. При довольно низких значениях общей сохранности (см. рис. 1) эти данные свидетельствуют о криоселективном действии программы, направленном на сохранение именно стероидпродуцирующих клеток в СКИ.

indices for cells cryopreserved on program 1 (Fig. 2). The same result on steroid production was obtained when increasing the cooling rate up to 20–25°C/min within temperature interval from –40 to –70°C (program 5, Fig. 2). However herewith total cell survival and that for HSD⁺-cells increased (program 5, see Fig. 2), testifying to a positive effect of more rapid cooling rates within given temperature interval during cryopreservation.

Thus cooling within the temperature interval of –40 down to –70°C during freezing of ICS should take place with certain rate (20–25°C/min) with no admission of uncontrolled cooling by sample submerging into liquid nitrogen after achieving the temperature of –40°C (program 1).

The effect of increasing the indices of cell survival when using relatively rapid cooling rates (15–20°C/min) after overcooling withdrawal when cooling down to the temperature –40°C (program 3) was higher than when rising the cooling rate within the temperature interval –40 to –70°C (program 5).

The attention should be paid to the fact that cooling of the samples for programs 4 and 5 down to –40°C was performed similarly with the constant rate of 1–2°C/min to determine the dependency of cell survival only on cooling within sub-eutectic temperature interval. Herewith the absence of significant rise in synthesis of testosterone secretion particularly in response to CG when using programs 4 and 5 once again confirms the failure of application of slow cooling rates namely at biological system crystallization stages (to –40°C). But a rise in the survival of HSD⁺-cells when using the program 5 testifies to a need in controlling the rates at cooling stages lower than –40°C when further building-up of crystal structures takes place.

Taking into account the mentioned above effect of cooling rates at various stage of cryopreservation on survival and steroidogenic potential of ICS for adult rats, it would be expedient to design new cryopreservation protocol. For further researches with ICS the program 6 was used, it comprised a programmable with drawal of overcooling, rapid in comparison with program 1 cooling of samples within temperature interval of biological system re-crystallization and the one in comparison with program 4, freezing within the range of sub-eutectic temperatures of DMSO solutions.

When using program 6 there was obtained the highest survival of HSD⁺-cells, 83% (Fig. 1), which were responsible for production of androgens. The cells of interstitium after use of this freezing program possessed the highest ability both to basal and stimulated synthesis of testosterone (Fig. 2). The level of testosterone in incubation medium after CG stimulation was (75±6) nM/cells×10¹², that makes about 70% from the control. At quite low values of total survival (see Fig. 1) these data testify to cryoselective

Выводы

1. Полученные результаты подтверждают значение влияния различных скоростей охлаждения биологических объектов и необходимости их контролирования в различных температурных интервалах, а именно в интервале кристаллизации биологической системы и диапазоне субэвтектических температур раствора криопротектора.

2. Эффект повышения общей сохранности и сохранности ГСД⁺-клеток при использовании относительно быстрых скоростей охлаждения в интервале температур кристаллизации биологической системы после снятия переохлаждения (программа 3) был выше, чем при увеличении скорости охлаждения в субэвтектическом температурном интервале (программа 5).

3. Сочетание программного снятия переохлаждения и увеличения скоростей охлаждения в интервалах температур кристаллизации биологической системы до 15-20°C/мин и субэвтектическом диапазоне температур до 20-25°C/мин (программа 6) приводило к значительному увеличению сохранности ГСД⁺-клеток в СКИ и их способности к базальному и стимулированному синтезу и секреции тестостерона.

4. Показано действие скоростей охлаждения в различных температурных интервалах направленного на сохранность именно стероидпродуцирующих клеток в СКИ взрослых крыс.

Литература

1. Белоус А.М., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Замораживание и криопротекция. – М.: Высш. школа, 1987. – 80 с.
2. Бондаренко Т.П., Салех Дж. М. Абу Жаяб, Божок Г.А. и др. Коррекция гормонального статуса у кастрированных и с экспериментальным гипогонадизмом крыс путем алло- и ксенотрансплантации органотипических культур // Пробл. экологии та медицини. – 2003. – Т.7, №1-2. – С. 3-7.
3. Вода и водные растворы при температурах ниже 0°C/ Под общей ред. А.М. Белоуса, В.Д. Зинченко. – Киев: Наук. думка. – 1985. – 387 с.
4. Гурина Т.М., Кирилук А.Л., Высеканцев И.П. Влияние контролируемых скоростей охлаждения при температурах ниже –30°C на жизнеспособность криоконсервированных дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* // Медицина сегодня и завтра. – 2008. – №1. – С. 81-84.
5. Гурина Т.М., Книш О.В., Компанієць А.М. Дослідження впливу швидкості охолодження в різних температурних інтервалах на ступінь пошкодження тромбоцитів // Пробл. криобиології. – 2007. – Т.17, № 1. – С. 16-24.
6. Кирпатовский И.Д., Дендеберов Е.С. Аллотрансплантация культивированных неонатальных андрогенпродуцирующих клеток Лейдига // Вестник рос.акад. мед. наук. – 1994. – №4. – С. 42-46.
7. Кирпатовский И.Д., Лубяко А.А., Кирпатовский В.И. Проблема защиты репродуктивного здоровья мужчин // Вестник реабилитации органов и тканей. – 2004. – №1. – С. 44-49.
8. Меньшиков В.В. Лабораторные методы исследования. Справочник. – М.: Медицина, 1987. – 398 с.

action of the program, directed to preservation of exactly steroid-producing cells in ICS.

Conclusions

1. The obtained results confirms the value of effect of different cooling rates of biological objects and necessity of their controlling within various temperature intervals, namely within the one of biological system crystallization and that for sub-eutectic temperatures of cryoprotectants' solution.

2. Effect of the increase of total survival and that for HSD⁺-cells when using relatively rapid cooling rates after overcooling withdrawal (program 3) was higher than during a rise in cooling rate within sub-eutectic temperature interval (program 5).

3. Combination of programmed withdrawal of overcooling and rise in cooling rates within temperature intervals of biological system crystallization up to 15-20°C/min (program 6) resulted in significant increased survival of HSD⁺-cells in ICS and their ability to basal and stimulated synthesis and testosterone secretion.

4. The effect of cooling rates under various temperature intervals directed to the survival of namely steroid-producing cells in ICS of adult rats has been demonstrated.

References

1. Belous A.M., Gordienko E.A., Rozanov L.F. Freezing and cryoprotection. – Moscow: Vysshaya shkola, 1987. – 80p.
2. Bondarenko T.P., Saleh J. M. Abu Jajab, Bozhok G.A. etc. Correction of hormonal status of castrated rats and those with hypogonadism by means of allo- and xenotransplantation of organotypic cultures. // Problemy Ekologii ta Meditsyny. – 2003. – Vol. 7, N1-2. – P. 3-7.
3. Water and aqueous solutions at temperatures below 0°C/ ed. by A.M. Belous, V.D. Zinchenko. – Kiev: Naukova dumka. – 1985. – 387 p.
4. Gurina T.M., Kirilyuk A.L., Vysekantsev I.P. Effect of controlled cooling rates at temperatures below –30°C on viability of cryopreserved yeasts *Saccharomyces cerevisiae* // Meditsyna segodnya i zavtra. – 2008. – N.1. – P. 81-84.
5. Gurina T.M., Knysh O.V., Kompaniets A.M. Studying the cooling rate effect within different temperature range on platelet damage extent // Problems of Cryobiology. – 2007. – Vol.17, N1. – P 16-24.
6. Kirpatovsky I.D., Dendeberov E.S. Allotransplantation of cultured neonatal androgen-producing Leydig cells // Vestnik Ros. Akad. Nauk. – 1994. – N4. – P. 42-46.
7. Kirpatovsky I.D., Lubyako A.A., Kirpatovsky V.I. Problem of protection of male reproductive health // Vestnyk Reabilitatsii Organov i Tkaney. – 2004. – N1. – P. 44-49.
8. Menshikov V.V. Laboratory research methods: Reference book. – Moscow: Meditsina, 1987. – 398p.
9. Osetsky A.I., Kirilyuk A.L., Gurina T.M., Vysekantsev I.P. Application of plastic strain method to determine threshold concentrations for cryoprotective substances during *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell cryopreservation // Problems of Cryobiology. – 2007. – Vol. 17, N1. – P. 71-79.
10. Saleh J. Abu Jajab. Correction of androgen function in experimental animals by means of transplantation of native and cryopreserved organ cultures of testes: Thesis of the cand.biol.sci. – Kharkov, 2004. – 129 p.

9. *Осецкий А.И., Кирилюк А.Л., Гурина Т.М., Высеканцев И.П.* Применение метода пластической деформации для определения пороговых концентраций криопротекторных веществ при криоконсервировании дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae* // Пробл. криобиологии.– 2007.– Т. 17, №1.– С. 71-79.
10. *Салех Дж. М. Абу Жаяб* Коррекция андрогенной функции у экспериментальных животных путем трансплантации нативных и криоконсервированных органных культур семенников: Дис. ... канд. биол. наук.– Харьков, 2004.– 129 с.
11. *Benton L., Shan L.X., Hardy M.P.* Differentiation of adult Leydig cells // J. Steroid Biochem. Mol. Biol.– 1995.– Vol. 53, N1-6.– P. 61-68.
12. *Keros V., Rosenlund B., Hultenby K. et al.* Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants // Hum. Reprod.– 2005.– Vol. 20, N6.– P. 1676-1687.
13. *Kyryliuk G.L., Osetsky A.I., Gurina T.M.* Physical substantiation of three-step freeze-thawing as optimal regimen for changing temperature during biological system cryopreservation // Proceedings of the 43rd Meeting of the Society for Cryobiology.– Hamburg, 2006.– P. 15.
14. *Tai J., Tze W.J., Johnson H.W.* Cryopreservation of rat Leydig cells for *in vitro* and *in vivo* studies // Horm. Metab. Res.– 1994.– Vol. 26, N3.– P. 145-147.
11. *Benton L., Shan L.X., Hardy M.P.* Differentiation of adult Leydig cells // J. Steroid Biochem. Mol. Biol.– 1995.– Vol. 53, N1-6.– P. 61-68.
12. *Keros V., Rosenlund B., Hultenby K. et al.* Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants // Hum. Reprod.– 2005.– Vol. 20, N6.– P. 1676-1687.
13. *Kyryliuk G.L., Osetsky A.I., Gurina T.M.* Physical substantiation of three-step freeze-thawing as optimal regimen for changing temperature during biological system cryopreservation // Proceedings of the 43rd Meeting of the Society for Cryobiology.– Hamburg, 2006.– P. 15.
14. *Tai J., Tze W.J., Johnson H.W.* Cryopreservation of rat Leydig cells for *in vitro* and *in vivo* studies // Horm. Metab. Res.– 1994.– Vol. 26, N3.– P. 145-147.

Accepted in 11.12.2007.

Поступила 11.12.2007