

Гормонопродуцирующая способность клеток интерстиция семенников и органотипической культуры семенников новорожденных поросят после криоконсервирования

UDC 57.043.085.2.:577.175.624

A.V. PAKHOMOV, G.A. BOZHOK, E.I. LEGACH, T.P. BONDARENKO

Hormone-Producing Ability of Testicular Interstitial Cells and Organotypic Testicular Culture of Newborn Piglets After Cryopreservation

В работе проведен сравнительный анализ способности клеток интерстиция семенников новорожденных поросят и органотипической культуры семенников новорожденных поросят к базальной и стимулированной продукции тестостерона после криоконсервирования. Были показаны различные пути активации стероидогенеза после процедур эквilibрации с криопротектором и замораживания-отогрева.

Ключевые слова: органотипическая культура, семенники, клетки интерстиция, криоконсервирование.

В роботі проведено порівняльний аналіз здатності клітин інтерстиція сім'яників новонароджених поросят і органотипової культури сім'яників новонароджених поросят до базальної і стимульованої продукції тестостерону після криоконсервування. Були показані різні шляхи активації стероїдогенезу після процедур еквилібрації з криопротектором і заморожування-відігріву.

Ключові слова: органотипова культура, сім'яники, клітини інтерстиція, криоконсервування.

The ability of newborn piglet testicular interstitial cells and organotypic testicular culture to basal and stimulated testosterone production after cryopreservation has been comparatively analysed. There were shown different ways of steroidogenesis activation after equilibration with cryoprotectant and freeze-thawing procedures.

Key-words: organotypic culture, testes, interstitial cells, cryopreservation.

Трансплантация клеток и тканей эндокринных органов – один из способов коррекции первичной гормональной недостаточности мужских половых гормонов различной этиологии. Аллогенный или ксеногенный материал имеет ряд преимуществ по сравнению с экзогенными гормональными препаратами. Он может эффективно включаться в общие системы регуляции организма, тем самым создавая более адекватные условия ответа организма на внутренние и внешние стимулы: изменение температуры, смену сезонов, погоды, многочисленные стрессорные факторы (травмы, голод, холод, различные хирургические, терапевтические воздействия) и т.д.

В этой связи при работе с эндокринным материалом очень важно, чтобы он не терял своих свойств, позволяющих организму и трансплантату осуществлять взаимный контроль и регуляцию по принципу прямой и обратной связи.

При работе с биологическим материалом неизбежно возникает проблема его долгосрочного хранения и транспортировки. Низкотемпературное консервирование не только позволяет хранить,

Cell and tissue transplantation of endocrine organs is one of the ways to correct a primary hormone failure of male sexual hormones of different etiology. Allogenic or xenogenic materials have some advantages compared to exogenous hormone preparations. They may be actively involved into general systems of organism regulation, thereby creating more adequate conditions for organism response to internal and external stimuli: temperature change, seasonal turn, weather, numerous stress factors (traumas, starvation, cold, different surgical, therapeutic effects) etc.

Owing to this fact when operating with endocrine material of importance is to have a material not losing its properties, enabling the organism and transplant to realise a mutual control and regulation according to the direct-back communication principle.

When operating with biological material the problem of its long-term storage and transportation is certain to occur. Low temperature preservation not only enables the biological material storing, transporting, but preserving a wide range of its inherent properties as well. However it is impossible to be sure how the object will act after freeze-thawing.

Институт проблем криобиологии 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. Перейславская, 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

перевозить биологический материал, но и сохранять широкий спектр присущих ему свойств. Однако невозможно уверенно сказать, как поведет себя объект после замораживания-отогрева.

Имеются данные, что некоторые неспецифические воздействия на гормонопродуцирующие клетки могут приводить к изменению характера секреции. Так, в [7, 8] отмечена неспецифическая активация стероидогенеза в клетках Y-1 – мышинных опухолевых клетках коры надпочечников, крысиных адренокортикальных клетках после воздействия таких ингибиторов сборки микротрубочек, как колхицин, винбластин, нокодазон. По мнению авторов работ это связано с более свободным распределением субстрата синтеза гормонов – холестерина – и поступлением в митохондрии, где происходят первые этапы его превращения в тестостерон. Подобную активацию наблюдали после разрушения промежуточных микрофиламентов под воздействием акриламида [9]. При этом следует отметить, что все вышеперечисленные нарушения внутриклеточной архитектуры увеличивали базальную секрецию и значительно снижали стимулированную секрецию.

Добавление диметилсульфоксида (ДМСО) к культивируемым β -клеткам и островкам Лангерганса крыс существенно увеличивает секрецию базальной, но не стимулированной глюкозой секреции инсулина, что, как полагают, вызвано изменением барьерных свойств мембраны, увеличением пассивного освобождения гормона из клеток [1, 6].

Таким образом, вопрос об особенностях секреции в эндокринных тканях после воздействия некоторых физических и химических агентов, и в частности активации секреции в стероидогенных тканях, остается открытым.

В данной работе был проведен сравнительный анализ способности клеток интерстиция семенников (КИС) новорожденных поросят и органотипической культуры семенников (ОКС) новорожденных поросят к продукции тестостерона после криоконсервирования в присутствии ДМСО.

Материалы и методы

Клетки интерстиция семенников новорожденных поросят получали после экстирпации семенников, освобождения их от оболочки и измельчения. Ткань обрабатывали средой 199 с коллагеназой (5 мг/мл) на протяжении 15 мин. Затем осуществляли первичное осаждение тубулярных структур. После разделения в градиенте сахарозы фракцию клеток плотностью 1,047-1,100 г/см³ собирали и отмывали средой 199 с 20 мМ HEPES (pH 7,4).

Органотипическую культуру семенников новорожденных поросят получали по методу [2] в среде

There are data about the fact, that some non-specific effects on hormone-producing cells may result in a change in secretion character. Thus, in the papers [7, 8] there was noted a non-specific activation of steroidogenesis in Y-1 cells: murine tumour cells of adrenal cortex, rat adrenocortical cells after affecting of such inhibitors of microtubule assembly, as colchicine, vinblastine, nocodazole. The authors consider this fact as being associated to more free distribution of hormone synthesis substrate: cholesterol and entering into mitochondria where the first stages of its transformation to testosterone occur. Similar activation was observed after destroying intermediate microfilaments under acrylamide effect [9]. At the same time of note is that all the mentioned above disorders in intracellular architecture increased a basal secretion, but significantly reduced a stimulated one.

Adding dimethyl sulfoxide (DMSO) into the cultured rat β -cells and Langerhans islets significantly decreases the secretion of basal, but not glucose-stimulated insulin secretion that is believed as resulted from alteration of membrane barrier properties, increase in passive hormone release out of cells [1, 6].

Thus, the question about secretion peculiarities in endocrine tissues after some physical and chemical agent effect and, in particular, secretion activation in steroidogenic tissues is still open.

In this work the comparative analysis of the capabilities of newborn piglet testicular interstitial cells (TIC) and organotypic testicular culture (OTC) to produce testosterone after cryopreservation in DMSO presence was performed.

Materials and methods

The procedure for newborn piglet testicular interstitial cell procurement was as follows. After extirpating testes were demembrated and minced. Tissue was treated using collagenase-contained medium 199 (5 mg/ml) for 15 min. Then the tubular structures were primarily precipitated. After dividing in sucrose gradient the cell fraction was completely collected 1.047-1.100 g/cm³ and washed-out with 20 mM HEPES-contained medium 199 (pH 7.4).

Organotypic culture of newborn piglet testes was procured according to the method [2] in RPMI medium with 10% embryonic calf serum and antibiotics.

Newborn piglet interstitial cells and OTC were frozen in DMSO presence using Cryoson programmable freezer (Germany) with 1°C/min rate down to -70°C with following immersion into liquid nitrogen. Material was thawed on water bath at 40°C up to a liquid phase appearance. The 5, 10, 15% DMSO concentrations were used in the work. Incubation with DMSO was done at 2°C for 30 min.

Basal and stimulated secretions of TIC and OTC were studied after cryoprotectant removal.

RPMI с 10%-й эмбриональной телячьей сывороткой и антибиотиками.

Клетки интерстиция и ОКС новорожденных поросят замораживали в присутствии криопротектора ДМСО на программном замораживателе Cryoson (Германия) со скоростью 1°C/ мин до -70°C с последующим погружением в жидкий азот. Отогревали материал на водяной бане при 40°C до появления жидкой фазы. В работе использовали 5, 10, 15%-е концентрации ДМСО. Инкубацию с ДМСО проводили при 2°C на протяжении 30 мин.

Базальную и стимулированную секреции КИС и ОКС исследовали после удаления криопротектора.

Стимуляцию секреции КИС проводили хорионическим гонадотропином (ХГ) – 1МЕ/мл. Клетки выдерживали 1 ч при 35°C, после чего супернатант исследовали на содержание тестостерона. Стимуляцию секреции ОКС проводили дибутирил-цАМФ на протяжении 6 ч инкубации. Уровень тестостерона в среде инкубации измеряли радиоиммунологическим методом с использованием тест-наборов “РИА СТ-тестостерон” (Беларусь). Пересчет содержания тестостерона в среде культивирования для КИС новорожденных поросят проводили на количество клеток, а для ОКС – на количество белка, которое измеряли по методу Бредфорд. Жизнеспособность и сохранность КИС и ОКС новорожденных поросят перед культивированием контролировали методом суправитального окрашивания трипановым синим.

Статистическую обработку результатов осуществляли по методу Стьюдента-Фишера.

Результаты и обсуждение

Одной из задач нашей работы было изучение способности ДМСО влиять на гормонопродукцию. В ходе эксперимента было показано, что ДМСО не оказывал влияния на базальный стероидогенез клеток интерстиция. Содержание тестостерона оставалось на уровне 1,6 нмоль/кл $\times 10^7$ и практически не изменялось при любых концентрациях ДМСО (рис.1, а). На стимуляцию ХГ клетки отвечали значительным увеличением стероидогенеза. Этот эффект носил концентрационно-зависимый характер от содержания ДМСО в растворе, где находились клетки. Так, при отсутствии и 5%-й концентрации ДМСО содержание тестостерона в средах инкубации возрастало до 7,15 и 11,5 нмоль/кл $\times 10^7$, а в суспензии клеток, инкубированных в 10 и 15%-х растворах ДМСО, уменьшалось до 4,05 и 2,5 соответственно.

Увеличение ХГ-стимулированной гормонопродукции в присутствии 5% ДМСО, вероятно, связано с облегчением транспорта субстратов синтеза гормонов в результате объемных колебаний клеток,

Stimulation of TIC secretion was carried-out with 1 IU/ml chorionic gonadotropin (CG). Cells were exposed for 1 hr at 35°C with following supernatant study for testosterone content. Stimulation of OTC secretion was performed with dibutyryl-cAMP for 6 hrs of incubation. Testosterone level in incubation medium was radioimmunologically measured using “RIA ST-testosterone” test-kit (Belarus). Testosterone content in culture medium for newborn piglet TIC was recounted per cell number and for OTC in was done per gram of protein, measured by Bradford method. Newborn piglet TIC and OTC viability and integrity before culturing were controlled using the method of supravital staining with trypan blue.

Results were statistically processed with Student-Fisher method.

Results and discussion

One of our research tasks was to study the DMSO ability to affect the hormone production. During experiment DMSO was shown as not affecting basal steroidogenesis of interstitial cells. Testosterone level was 1.6 nmol/cells $\times 10^7$ and did not practically change under any DMSO concentrations (Fig. 1, a). Cell response to the CG stimulation was manifested in considerable steroidogenesis increase. This effect was concentration-dependent on DMSO content in solution, where cell equilibration occurred. Thus, at absent and 5% DMSO concentration testosterone content in incubation media increased up to 7.15 and 11.5 nmol/cells $\times 10^7$, but in cell suspension, incubated at 10 and 15% DMSO it reduced down to 4.05 and 2.5, correspondingly.

Increase in CG-stimulated hormone production in 5% DMSO presence is probably associated to transport facilitation of hormone synthesis substrates as a result of volume cell oscillations, change in membrane fluidity [1, 10] and a further increase in DMSO concentration results in inhibition of such protein-steroidogenesis activators as StAR, SAP, SCP2 etc. [11], which are expressed in response to cell stimulation. Moreover 15% DMSO significantly decreased the interstitial cell viability, that was sharply affected steroidogenesis activity as well.

Testosterone level in OTC incubation medium with DMSO for non-stimulated culture in incubation medium was 20 nmol/mg of protein. DMSO concentration rise did not affect the change of testosterone concentration in incubation medium (Fig. 2, a). Adding dibutyryl-cAMP steroidogenesis stimulator did not result in OTC secretion augmentation 6 hrs after incubation in cryoprotectant-free medium. Meanwhile at the background of preliminary incubation with DMSO there was observed a dibutyryl-cAMP stimulated testosterone secretion, being in a concentration dependency on DMSO presence in incubation medium, 5 and 10% DMSO increased steroidogenesis up to 234 and

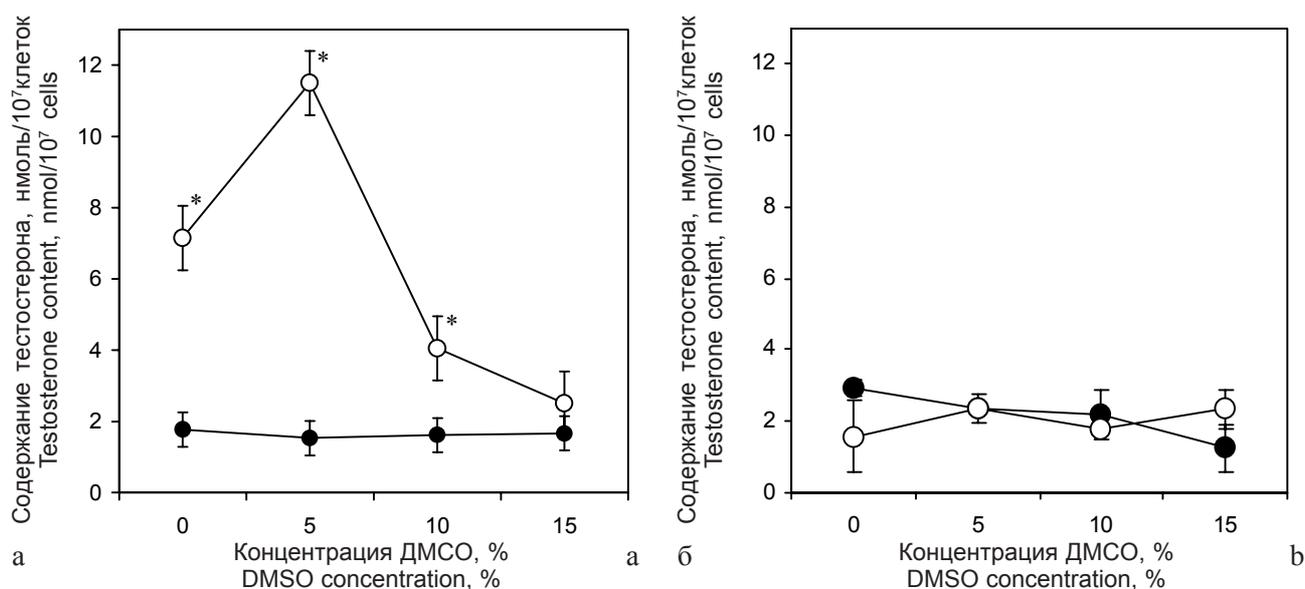


Рис. 1. Секретия тестостерона нативными (а) и замороженными-отогретыми (б) клетками интерстиция семенников в зависимости от концентрации ДМСО в среде инкубации: ● – базальная; ○ – стимулированная; * – различия стимулированной секреции достоверны по сравнению с соответствующей базальной ($P < 0,05$).

Fig. 1. Testosterone secretion by native (a) and frozen-thawed (b) testicular interstitial cells dependent on DMSO concentration in incubation medium: ● – basal; ○ – stimulated; * – differences of stimulated secretion are statistically significant compared to corresponding basal one ($P < 0,05$).

изменением текучести мембран [1, 10], а дальнейшее увеличение концентрации ДМСО приводит к ингибированию таких белков-активаторов стероидогенеза, как StAR, SAP, SCP2 и др. [11], которые экспрессируются в ответ на стимуляцию клеток. Более того, ДМСО в концентрации 15% значительно снижал жизнеспособность клеток интерстиция, что резко сказывалось и на активности стероидогенеза.

Содержание тестостерона в среде инкубации ОКС с ДМСО для нестимулированной культуры составляло 20 нмоль/мг белка. Увеличение концентрации ДМСО не оказывало какого-либо влияния на изменение концентрации тестостерона в среде (рис. 2, а). Добавление стимулятора стероидогенеза дибутирил-цАМФ не приводило к увеличению секреции ОКС новорожденных поросят в течение 6 ч при отсутствии криопротектора в среде. Тогда как на фоне преинкубации с ДМСО наблюдалась дибутирил-цАМФ стимулированная секреция тестостерона, которая находилась в концентрационной зависимости от присутствия ДМСО в среде инкубации: ДМСО в концентрациях 5 и 10% увеличивал стероидогенез до 234 и 408 нмоль/мг белка соответственно, а в концентрации 15% резко угнетал гормонопродукцию. Жизнеспособность ОКС новорожденных поросят практически не изменялась с увеличением концентрации ДМСО. Увеличение секреции на фоне преинкубации ОКС новорожденных поросят с 5 и 10% ДМСО, вероятно, связано с облегчением проникновения активатора стероидогенеза во фрагменты ОКС и запус-

408 nmol/mg of protein, correspondingly, and 15% one sharply suppressed hormone-production. The newborn piglet OTC viability did not practically change with DMSO concentration rise. Secretion increase at the background of preliminary incubation of newborn piglet OTC with 5 and 10% DMSO is probably associated to facilitating penetration of steroidogenesis activator into newborn piglet OTC fragments and triggering a stimulated hormone synthesis, mediated by protein-activators of steroidogenesis [1, 3, 5]. Higher DMSO concentrations showed a toxic effect on the newborn piglet OTC cells.

After newborn piglet TICs freeze-thawing the highest cell integrity was found in the culture with 10% DMSO. However the capability to synthesise testosterone right before thawing and washing-out of cryoprotectant in response to CG stimulation was very low and did not practically differ from a basal hormone-production: 2.00 and 2.19 nmol/cells $\times 10^7$, correspondingly (Fig. 1, b). This is confirmed by steroidogenesis inhibition with DMSO in 10% concentration under incubation with cryoprotectant before freezing.

After newborn piglet OTC freeze-thawing there was observed a 10-fold increase in testosterone basal secretion and activation of hormone-production in culture, frozen-thawed under 10% DMSO protection (Fig. 2, b). In the culture frozen-thawed in the presence of 5% DMSO the testosterone level remained on the control level. Culture did not respond to dibutyryl-cAMP stimulation. The character of changes in testosterone content was similar to that without activator and incubated in DMSO solution. The effect

ком стимулированного синтеза гормона, опосредованного белками-активаторами стероидогенеза [1, 3, 5]. Более высокие концентрации ДМСО оказывали токсическое действие на клетки ОКС новорожденных поросят.

После замораживания-отогрева КИС новорожденных поросят наиболее высокую сохранность клеток наблюдали в культуре с 10%-й концентрацией ДМСО. Однако способность синтезировать тестостерон непосредственно после отогрева и отмывки от криопротектора в ответ на стимуляцию ХГ была очень низкой и практически не отличалась от базальной гормонопродукции – 2,00 и 2,19 нмоль/кл $\times 10^7$ соответственно (рис. 1, б), что совпадает с наблюдениями ингибирования стероидогенеза ДМСО в концентрации 10% при инкубации с криопротектором до замораживания.

После замораживания-отогрева ОКС новорожденных поросят в присутствии 10% ДМСО наблюдали 10-кратное увеличение базальной секреции тестостерона (140 нмоль/мг белка) и активацию гормонопродукции в культуре (рис. 2, б). В культурах замороженной-отогретой в присутствии 5% ДМСО уровень тестостерона оставался на уровне контроля. Культура не отвечала на стимуляцию дибутирил-цАМФ. Характер изменений содержания тестостерона был аналогичен изменениям в культуре без активатора инкубировавшейся с растворами ДМСО. Эффект 10-кратного возрастания базальной секреции не был связан с прямым выходом гормона в результате разрушения клеток, так как их сохранность составляла 70%.

Возникает вопрос, что может происходить с клетками и фрагментами тканей семенника после инкубации в 10%-м растворе ДМСО? Известно, что ДМСО изменяет осмотические характеристики клетки, ее объем, вязкость липидного бислоя, характер распределения внутримембранных частиц, барьерно-транспортные функции мембраны, структурную организацию цитоскелета, что может приводить к увеличению активности определенных биохимических процессов [1, 4]. Например, увеличению стимулированной ХГ и цАМФ продукции стероидов в КИС и ОКС новорожденных поросят на фоне преинкубации с ДМСО, а также увеличению базальной секреции ОКС новорожденных поросят замороженных-отогретых в присутствии 10% ДМСО, показанному в данной работе. Однако влияние факторов криоконсервирования может привести к отсутствию ответа на стимуляцию гормональной продукции стероидов в КИС и ОКС новорожденных поросят после замораживания-отогрева. В обоих случаях он был угнетен и изменялся аналогично базальному на фоне преинкубации в растворах ДМСО. Это может свидетельствовать об активации процессов, направленных на восста-

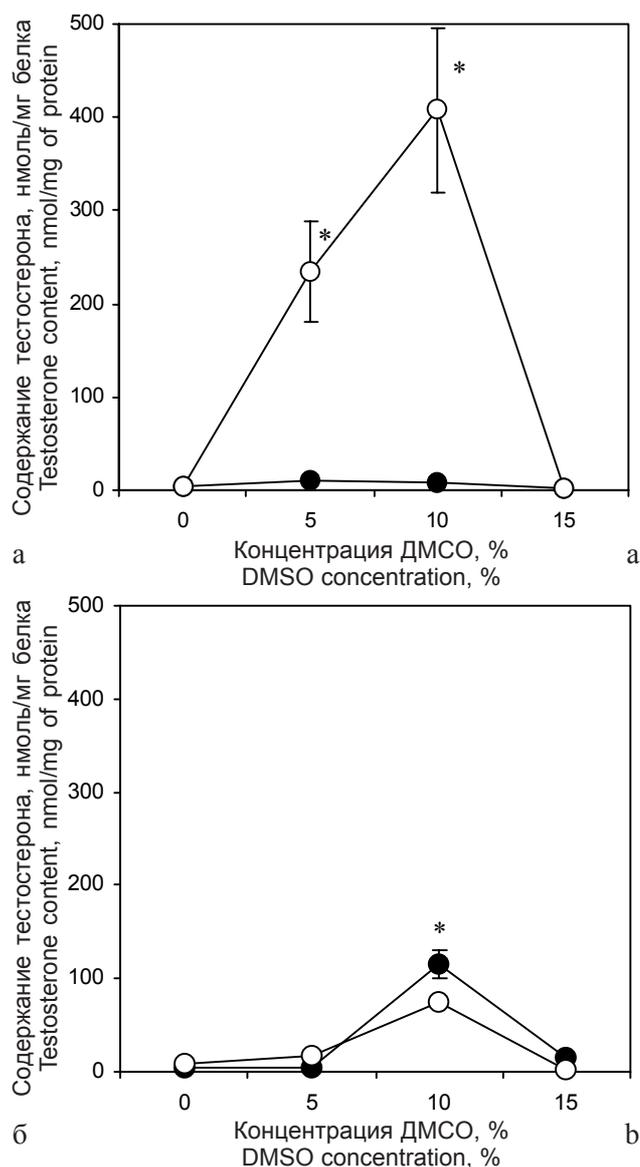


Рис. 2. Секреция тестостерона нативной (а) и замороженной-отогретой (б) ОКС новорожденных поросят в зависимости от концентрации ДМСО в среде инкубации: ● – базальная; ○ – стимулированная; * – различия стимулированной секреции достоверны по сравнению с соответствующей базальной ($P < 0,05$).

Fig. 2. Basal and stimulated testosterone secretion by native (a) and cryopreserved (b) newborn piglet OTC dependent on DMSO concentration in incubation medium: ● – basal; ○ – stimulated; * – differences of stimulated secretion are statistically significant compared to corresponding basal one ($P < 0.05$).

of a 10-fold increase of basal secretion was not related to a direct hormone release as a result of cell destruction because their integrity made 70%.

The question arises: what may occur with cells and testicular tissue fragments after incubation with 10% DMSO solution. DMSO is known to change cell osmotic characteristics, volume, lipid bilayer viscosity, character of intramembrane particle distribution, barrier-transport membrane functions, cytoskeletal structural organisation, that may result in activity

новление клеточных структур, а не на синтез гормонов. Увеличение базального стероидогенеза в ОКС новорожденных поросят после замораживания-отогрева, по-видимому, связано с нарушением пространственных структур внутри клеток, аналогичное тому, которое характерно для клеток после воздействия колхицина, винбластина, акриламида [10, 11], что проявилось в более свободном доступе субстрата синтеза гормонов (холестерина) в места их синтеза – к митохондриям.

Таким образом, установлено, что КИС и ОКС новорожденных поросят неодинаково реагируют на замораживание-отогрев. Применение рекультивирования возможно устранил отсутствие реакции на стимуляцию ХГ и дибутирил-цАМФ после криоконсервирования на фоне высокой сохранности биологического материала.

Выводы

Полученные данные позволяют сделать выводы о различных путях стероидогенеза на фоне преинкубации с ДМСО. Преинкубация с ДМСО способствует увеличению стимулированной гормонопродукции через облегчение поступления дибутирил-цАМФ и ХГ к клеткам и запуска цАМФ-зависимых процессов. Увеличение базальной секреции и характер изменений стимулированной секреции ОКС после замораживания-отогрева свидетельствуют о неспецифической активации гормональной продукции, происходящей в процессе криоконсервирования.

Литература

1. Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С. Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов.– Киев: Наук. думка, 1993. – 244 с.
2. Потіха О.П., Челнакова І.С., Турчин І.С. Ауто- та ксено-трансплантація органних культур сім'яників кастрованим щурам та щурам із експериментальним гіпогонадізмом // Физиолог. журнал.– 1993.– Т. 39., №5-6.- С. 70-75.
3. Bruijne A.W., Steveninck J.V. The influence of dimethylsilfoxide on the red cell membrane // Biochem. Pharmacol.– 1974.– Vol. 23, N23.–P. 3247-3258.
4. Buckner C.D., Appelbaum F.R., Thomas F.D. Bone marrow and fetal liver // Organ preservation for transplantation / Eds.: Karow A.M., Pegg D.E.– New York, Dekker, 1981.– P. 355-375.
5. Freeman D.A. Cyclic AMP mediated modification of cholesterol traffic in Leydig tumor cells // J. Biol. Chem.– 1987.– Vol. 262, N27.– P. 13061-13068.
6. McKay D.B. Karow A.M. A functional analysis on isolated rat islets of Langerhans: effects of dimethylsulfoxide and low-temperature preservation // Cryobiology.– 1983.– Vol. 20, N1.– P. 41-50.
7. Ray P., Strott C.A. Stimulation of steroid synthesis by normal rat adrenocortical cells in response to antimicrotubular agents // Endocrinology.– 1978.– Vol. 103, N4.– P. 1281-1288.
8. Sackett D.L., Wolff J. Cyclic AMP-independent stimulation of steroidogenesis in Y-1 adrenal tumor cells by antimicrotubular agents // Biochim. Biophys. Acta.– 1986.– Vol. 888, N2.– P. 163-170.

increase of certain biochemical processes [1, 4]. An increase in CG and cAMP stimulated steroid production in newborn piglet TIC and OTC at the background of preincubation with DMSO, as well as an increase in basal secretion of newborn piglet OTC, frozen-thawed with 10% DMSO, obtained in this research may serve as an example. But the effect of cryopreservation factors may result in absence of response to stimulation of steroid hormone production in newborn piglet TIC and OTC after freeze-thawing. In both cases it was suppressed and changed like a basal one with preincubation in DMSO solutions. This may testify to activation of processes, directed to cell structure recovery but not to hormone synthesis. Basal steroidogenesis increase in newborn piglet OTC after freeze-thawing is apparently associated to disorder in cell steric structures, similar to the effects of colchicine, vinblastine, acrylamide [10, 11], that was manifested in more free access of hormone (cholesterol) synthesis substrate in their synthesis placem, to mitochondria.

Thus, newborn piglet TIC and OTC were established to unevenly respond to cryopreservation processes. Applying the reculture procedure after freeze-thawing will possibly contribute to eliminating such effects as response absence to CG and dibutyryl-cAMP stimulation after cryopreservation at the background of biological material high integrity.

Conclusions

The data obtained enable to conclude about different steroidogenesis ways at the background of preincubation with DMSO. The preincubation with DMSO contributes to an increase in stimulated hormone production via facilitation of dibutyryl-cAMP and CG entering into cells and triggering the cAMP-dependent processes. The basal secretion increase and change character of OTC stimulated secretion after freeze-thawing testify to a non-specific activation of hormone production, occurring during cryopreservation.

References

1. Grischenko V.I., Chujko V.A., Pushkar N.S. Endocrine organ tissue and cell cryopreservation.– Kiev: Nauk. Dumka, 1993.– 244 p.
2. Potikha O.P., Chelnakova I.S., Turchin I.S. Auto- and xenotransplantation of testicular organ cultures to castrated rats and those with experimental hypogonadism // Fiziol. zhurnal.– 1993.– Vol. 39, N5-6.– P. 70-75.
3. Bruijne A.W., Steveninck J.V. The influence of dimethylsilfoxide on the red cell membrane // Biochem. Pharmacol.– 1974.– Vol. 23, N23.–P. 3247-3258.
4. Buckner C.D., Appelbaum F.R., Thomas F.D. Bone marrow and fetal liver // Organ preservation for transplantation / Eds.: Karow A.M., Pegg D.E.– New York, Dekker, 1981.– P. 355-375.
5. Freeman D.A. Cyclic AMP mediated modification of cholesterol traffic in Leydig tumor cells // J. Biol. Chem.– 1987.– Vol. 262, N27.– P. 13061-13068.

9. *Shiver T.M., Sackett D.L., Knipling L., Wolff J.* Intermediate filaments and steroidogenesis in adrenal Y-1 cells: acrylamide stimulation of steroid production // *Endocrinology.*– 1992.– Vol. 131, N1.– P. 201-207.
10. *Stocco D.M., Clark B.J.* Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells//*Endocrine Rev.*–1996.– Vol. 17, N3.– P. 221-244.
11. *Temple R., Wolff J.* Stimulation of steroid secretion by antimicrotubular agents // *J. Biol. Chem.*– 1973.– Vol. 248, N8.– P. 2691-2692.

Поступила 09.01.2007

6. *McKay D.B., Karow A.M.* A functional analysis on isolated rat islets of Langerhans: effects of dimethylsulfoxide and low-temperature preservation // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 20, N1.– P. 41-50.
7. *Ray P., Strott C.A.* Stimulation of steroid synthesis by normal rat adrenocortical cells in response to antimicrotubular agents // *Endocrinology.*– 1978.– Vol. 103, N4.– P. 1281-1288.
8. *Sackett D.L., Wolff J.* Cyclic AMP-independent stimulation of steroidogenesis in Y-1 adrenal tumor cells by antimicrotubular agents // *Biochim. Biophys. Acta.*– 1986.– Vol. 888, N2.– P. 163-170.
9. *Shiver T.M., Sackett D.L., Knipling L., Wolff J.* Intermediate filaments and steroidogenesis in adrenal Y-1 cells: acrylamide stimulation of steroid production // *Endocrinology.*– 1992.– Vol. 131, N1.– P. 201-207.
10. *Stocco D.M., Clark B.J.* Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells//*Endocrine Rev.*–1996.– Vol. 17, N3.– P. 221-244.
11. *Temple R., Wolff J.* Stimulation of steroid secretion by antimicrotubular agents // *J. Biol. Chem.*– 1973.– Vol. 248, N8.– P. 2691-2692.

Accepted in 09.01.2007