

Влияние сохранения архитектоники ткани на криочувствительность надпочечных желез мышей и новорожденных поросят

В.Д. УСТИЧЕНКО, Н.М. АЛАБЕДАЛКАРИМ, Т.П. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Effect of keeping the tissue architecture on adrenal gland cryosensitivity in mice and newborn piglets

V.D. USTICHENKO, N.M. ALABEDALKARIM, T.P. BONDARENKO

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

Исследовали влияние сохранения тканевой архитектоники на криочувствительность суспензии клеток и фрагментов надпочечников мышей и новорожденных поросят. Показано, что фрагменты надпочечных желез более устойчивы к действию факторов низкотемпературного консервирования по сравнению с одиночными аденокортикальными клетками, что обеспечивает сохранение как базального, так и стимулированного стероидогенеза. Высокий диффузионный барьер во фрагментах изменяет их чувствительность к действию стимуляторов, эффективных при взаимодействии с внутриклеточными мишенями, но не влияет на регуляцию, осуществляемую через связывание с рецепторами, ориентированными во внеклеточное пространство.

Ключевые слова: аденокортикальные клетки, органная культура, криоконсервирование, базальная секреция, стимулированная секреция.

Досліджували вплив збереження тканинної архітектури на криочутливість суспензії клітин і фрагментів надниркових залоз мишей та новонароджених поросят. Показано, що фрагменти надниркових залоз більш стабільні до дії факторів низкотемпературного консервування в порівнянні з поодинокими аденокортикальними клітинами, що забезпечує збереження як базального, так і стимульованого стероїдогенезу. Високий дифузійний бар'єр у фрагментах змінює їх чутливість до дії стимуляторів, ефективних при взаємодії з внутрішньоклітинними мішенями, але не впливає на регуляцію, що здійснюється шляхом зв'язування з рецепторами, орієнтованими до зовнішньоклітинного простору.

Ключові слова: аденокортикальні клітини, органна культура, криоконсервування, базальна секреція, стимульована секреція.

We investigated the influence of keeping the histological architecture on the cryosensitivity of single cells suspension and fragments of mice and newborn piglets' adrenal glands. It was shown that the adrenal gland fragments were more resistant to effect of low temperature preservation factors, comparing to single adrenocortical cells, and as a result, had both basal and stimulated steroidogenesis. The highest diffusion barrier in fragments changes their sensitivity to effect of stimulators, efficient at the interaction with intracellular targets, but doesn't influence the regulation, which are realized due binding with receptors, directed to the cell outside.

Key-words: adrenocortical cells, organ culture, cryopreservation, basal secretion, stimulated secretion.

Аденокортикальная ткань – морфологически сложная структура, зональная дифференцированность которой регулирует ее гормонопродуцирующую активность. Для исследования функциональных характеристик клеток надпочечников традиционно используют как клеточные, так и органные культуры. Однако криочувствительность аденокортикальной ткани в большинстве случаев изучали на фрагментах, срезах [1, 9], что позволило разработать режим криоконсервирования для органной культуры. Для одиночных клеток надпочечников аналогичные исследования не проводились. Дезагрегация клеток, необходимая для получения клеточных культур, нарушает характерную гистотидическую архитектонику, но облегчает поступление субстрата или других потенциально регулирующих факторов, включая стимуляторы и ингибиторы, при последующем

Adrenocortical tissue is known to be a morphologically complicated structure, zonal differentiation of which regulates its hormone-producing activity. To study the functional characteristics of adrenal cells one traditionally uses both cell and tissue cultures. Adrenal tissue cryosensitivity however was mostly studied in fragments, sections [1, 9], that enabled us to elaborate the cryopreservation regimen for organ culture. For single adrenal cells such studies have not been performed. Cell disaggregating essential for cell culture obtaining was found to destroy the characteristic histiotidic architecture, but makes easier the influx of a substrate or other potentially regulating factors including the stimulators and inhibitors at further culturing. On one hand, diffusive barrier increases for organ cultures and limits the substrate's enzyme conversion into the product synthesized [5]; on another hand, organ culture, which is known to keep intercellular

Адрес для корреспонденции: Устиченко В.Д., Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, ул. Переяславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38 (057) 772-20-07, факс: +38 (057) 772-00-84, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Address for correspondence: Ustichenko V.D., Institute for Problems of Cryobiology & Cryomedicine of the Natl. Acad. Sci. of Ukraine, 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 772 2007, fax: +380 57 7720084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

культивировании. С одной стороны, для органных культур диффузионный барьер возрастает и лимитирует ферментативную конверсию субстрата в синтезируемый продукт [5], с другой – органная культура, которая сохраняет межклеточные взаимодействия между кортикальными и медулярными клетками, способствует стимуляции стероидогенеза [7].

Таким образом, различия в морфологической структуре клеточных и органных культур, проявляющиеся и в регуляции стероидогенеза, могут изменить чувствительность адренокортикальных клеток к действию факторов низкотемпературного консервирования. Целью нашей работы было сравнительное изучение влияния димексида (ДМ) и замораживания с различными скоростями на базальный и стимулированный стероидогенез суспензии клеток (СК) и фрагментов надпочечных желез.

Материалы и методы

Объектом исследования были надпочечники мышей и новорожденных поросят. Для изучения гормонопоза СК, которую получали механической дезагрегацией [3], и фрагменты (Фр) надпочечников мышей (1/4 железы) и новорожденных поросят (0,5-1 мм³) трехкратно отмывали средой RPMI и инкубировали при 37°C в среде RPMI, содержащей 10%-ю теплоинактивированную эмбриональную телячью сыворотку (ЭТС). Для изучения стимулированной секреции в среду инкубации добавляли дибутирил цАМФ, тироксин. Инкубацию СК с 5-15%-ми растворами ДМ на среде RPMI с 10%-й ЭТС проводили при 22°C в течение 20 мин. Замораживали СК и Фр после 5-минутной преинкубации с соответствующими концентрациями ДМ при 22°C в пластиковых контейнерах объемом 2 мл со скоростями 1-2°C/мин на программном замораживателе Cryoson, 40°C/мин – в парах жидкого азота и более 100°C/мин – 3-этапным погружением в жидкий азот. После 72 ч хранения в жидком азоте образцы отогревали при 42°C до появления жидкой фазы. Во всех экспериментах ДМ удаляли средой культивирования с 2-кратным центрифугированием (500g). Содержание кортизола в среде инкубации и гомогенатах Фр надпочечников новорожденных поросят измеряли радиоиммунологическим методом при помощи тест набора СТЕРОН-К-¹²⁵I-М (Беларусь) и нормировали на количество инкубированных клеток (для СК) или на грамм белка (для Фр). На всех этапах жизнеспособность клеток контролировали прижизненным красителем трипановым синим. За 100% принимали жизнеспособность клеток надпочечных желез непосредственно после получения клеточной суспензии. Обработывали данные по методу Стьюдента-Фишера.

bonds between cortical and medullar cells, promotes the steroidogenesis stimulation [7].

Thus, the differences in morphological structure of cell and organ cultures, manifesting also in the steroidogenesis regulation are capable of changing the sensitivity of adrenocortical cells to the effect of low temperature preservation factors.

The work was aimed to a comparative study of dimexide (DM) effect and various rates of freezing on basal and stimulated steroidogenesis of cell suspension (CS) and adrenal gland fragments.

Materials and methods

Adrenal glands of mice and newborn piglets were the objects under study. To study hormonopoiesis the cell suspension (CS) obtained by mechanical disaggregation [3] and mice adrenal gland fragments (Fr) (1/4 part of gland) and those of newborn piglets (0.5-1mm³) was thrice washed out by RPMI medium and incubated at 37°C under the same medium containing 10% heat-activated embryonic calf serum (ECS). To study the secretion being stimulated dibutiryl cAMP, thyroxin were added into the incubation medium. CS was incubated with 5 15% DM solutions based on RPMI medium with 10% ECS at 22°C for 20 min. CS and Fr were frozen following the 5-min pre-incubation with the corresponding DM concentrations at 22°C in 2ml plastic containers with the rate of 1-2°C/min using Cryoson programmable freezer, 40°C/min in liquid nitrogen vapors and more than 100°C/min by a 3-step immersion into liquid nitrogen. Following the 72-hrs' storage in liquid nitrogen the samples were frozen-thawed under 42°C up to liquid phase appearance. DM was removed in all the experiments using a culturing medium with twice centrifuging (500g). Cortisol content in the incubation medium and Fr homogenates of newborn piglets was measured radioisotopically using STERON-K-¹²⁵I-M (Belarus) and standardized either on the amount of incubated cells (for CS) or per gram of protein (for Fr). Cell viability was checked at all the stages by vital dye trypan blue staining. Adrenal cell viability immediately after cell suspension obtaining was assumed as 100%. The data were processed according to Student-Fisher's method.

Results and discussion

Fig. 1 demonstrates the basal secretion of 10⁶ adrenal cells of newborn piglets to be 3.35 nmol/l. Dibutiryl cAMP (1mM) stimulates the secretion additionally, rising it up to 14.69 nmol/l. Unlike the Fr adrenal glands of newborn piglets, for which there was demonstrated the absence of the DM effect on the viability and hormone-producing activity [1], a 20-min incubation with cryoprotectant at 22°C and its further removal resulted in a sharp fall of the amount of viable

Результаты и обсуждение

Из рис.1 видно, что базальная секреция 10^6 клеток надпочечников новорожденных поросят составляет 3,35 нмоль/л. Дибутрил цАМФ (1 мМ) дополнительно стимулирует секрецию, повышая ее до 14,69 нмоль/л. В отличие от Фр надпочечников новорожденных поросят, для которых было показано отсутствие влияния ДМ на жизнеспособность и гормонопродуцирующую активность [1], 20-минутная инкубация СК с криопротектором при 22°C и последующее его удаление привели к резкому снижению количества жизнеспособных клеток. Анализ секреторной активности СК показал, что секреция кортизола сохраняется на уровне контрольных значений после обработки 7%- и 10%-м ДМ и содержание кортизола увеличивается в среде инкубации для клеток, проинкубированных с 5%-м раствором ДМ. Необходимо отметить, что одиночные клетки надпочечников мышей оказались менее чувствительными к осмотическому воздействию проникающего криопротектора, хотя в 10%- и 15%-х растворах ДМ количество жизнеспособных клеток было достоверно ниже, чем в контроле (рис. 1). В связи с этим мы криоконсервировали СК мышей под защитой 7%-го ДМ со скоростями 1, 40 и более 100°C/мин. Учитывая, что продолжительная (30 мин) инкубация при положительных температурах в растворах ДМ приводит к подавлению активности аденилатциклазы аденокортикальных клеток [9], при криоконсервировании образцы насыщали криопротектором в течение 5 мин при 22°C, что могло быть особенно эффективно при медленных режимах замораживания. Из таблицы видно, что количество клеток в СК мышей, сохранившихся после замораживания-отогрева, повышается с увеличением скорости замораживания, но удаление криопротектора приводит к катастрофическому падению исследуемого параметра. В то же время криоконсервирование Фр мышей с соответствующими скоростями позволило сохранить большое количество жизнеспособных клеток после удаления криопротектора, особенно при замораживании со скоростью >100°C/мин (таблица).

В настоящее время для органных культур надпочечников новорожденных поросят наиболее адекватным считается метод криоконсервирования с 5%-м ДМ по двухэтапной программе [4]. Полученные позитивные результаты при быстром замораживании для Фр мышей (таблица) позволили нам криоконсервировать надпочечники новорожденных поросят со скоростью замораживания >100°C/мин, применяя как криопротектор ДМ в концентрациях 7-15%. Данные, представленные на рис. 2, свидетельствуют, что клетки криоконсервированных Фр надпочечников новорожденных

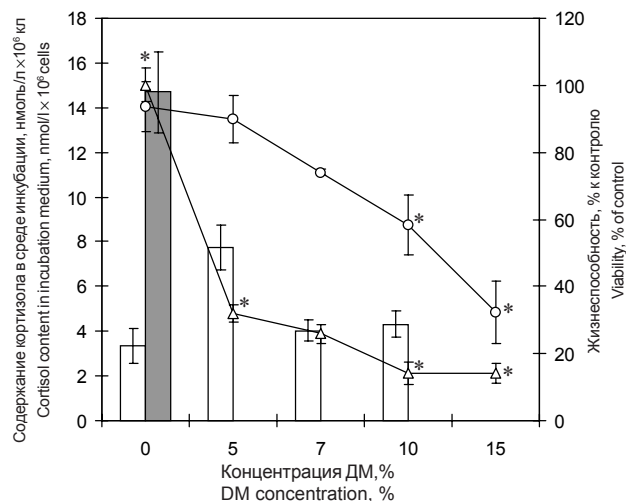


Рис. 1. Влияние преинкубации в различных концентрациях димексида на базальную (□) и дибутрил цАМФ-стимулированную (■) секрецию аденокортикальных клеток новорожденных поросят и жизнеспособность клеток надпочечных желез мышей (—○—) и новорожденных поросят (—△—). * – различия достоверны по отношению к нестимулированному контролю, $P < 0,05$.

Fig. 1. Effect of pre-incubation at various dimexide concentrations on basal (□) and dibutiril cAMP-stimulated (■) secretion and cell viability of adrenal glands derived from mice (—○—) and newborn piglets (—△—). * – differences are statistically true in respect of non-stimulated control, $P < 0.05$.

cells. Analysis of the secretory activity showed the cortisol secretion to remain at the level of control values after being treated with 7% and 10% DM, and to increase in the incubation medium for the cells incubated with 5% DM. It should be noted, that single adrenal gland murine cells were found to be less sensitive to the osmotic effect of penetrating cryoprotectant, although in 10% and 15% DM solutions the amount of viable cells was significantly lower, than in the control (Fig.1). Due to this fact we cryopreserved murine CS under the protection of 7% DM with the rates of 1, 40 and higher than 100°C/min. Taking into consideration that a long-term incubation (30 min) under positive temperatures in DM solutions results in the suppression of adenylate cyclase activity in adrenocortical cells [9], the samples during cryopreservation were saturated with cryoprotectant for 5 min at 22°C, that is thought to be efficient under slow freezing regimens. Table shows that the number of cells in murine CS, remained after freeze-thawing, increases along with the freezing rate rise, but the cryoprotectant removal causes a dramatic fall of the parameter under study. At the same time murine Fr cryopreservation with the corresponding rates enabled us to preserve the higher amount of viable cells after the cryoprotectant removal, especially when freezing with the rate of 100°C/min (Table).

Nowadays the cryopreservation method using 5% DM according to the two-step program for adrenal

поросят сохраняют высокую жизнеспособность (рис.2,а) и гормонопродуцирующую активность, не отличающуюся от исходной, при использовании 10%-го ДМ (рис. 2,б).

Криоконсервирование с более низкой (7%) и более высокой (15%) концентрациями ДМ привело к уменьшению количества жизнеспособных клеток после отогрева. Негативный эффект применения 15%-го раствора ДМ может быть связан как с цитотоксическим действием криопротектора, так и с критическими изменениями объема клеток при добавлении и удалении гипертонического раствора. Последний факт кажется более очевидным, особенно в связи с нашими данными, что добавление-удаление 15%-го раствора ДМ приводит к резкому снижению жизнеспособности СК как мышей, так и новорожденных поросят (рис. 1). Отсутствие выраженного криозащитного эффекта 7%-го ДМ, по сравнению с 10%-м раствором, по-видимому, обусловлено тем, что 5-минутная инкубация при 22°C и данной концентрации криопротектора недостаточна для оптимальной насыщенности клеток криозащитным веществом [2].

Одной из важнейших характеристик адренокортикальных клеток является их способность к увеличению секреции кортизола под действием специфических (АКТГ) и неспецифических (дибутирил цАМФ) стимуляторов. В отличие от СК как нативные, так и криоконсервированные Фр над-

Влияние режимов замораживания под защитой 7%-го ДМСО на клеточность СК и жизнеспособность клеток Фр надпочечников мышей

Effect of freezing regimens under the protection of 7% DMSO on CS cellularity and cell viability of mice adrenal gland fragments

Условия эксперимента Experiment conditions	Скорость замораживания, °C/мин Freezing rates, °C/min		
	1	40	100
Клеточность суспензии, % к контролю Suspension cell number, % to control			
После отогрева СК в криозащитной среде Following the CS warming under cryoprotective medium	19,23±4,81	20,60±0,69	44,04±0,8
После отогрева СК и удаления криопротектора Following the CS warming and cryoprotectant removal	0	0	14,01±0,8
Жизнеспособность клеток Фр, % к контролю Fr cell viability, % to the control			
После отогрева и удаления криопротектора Following the warming and cryoprotectant removal	47,76±4,23	57,10±5,50	69,77±5,96

gland organ cultures of newborn piglets is considered as the most adequate one [4]. Obtained by us positive results while using a rapid freezing for murine Fr (Table) enabled us to cryopreserve the adrenal glands of newborn piglets with the freezing rate of >100°C/min

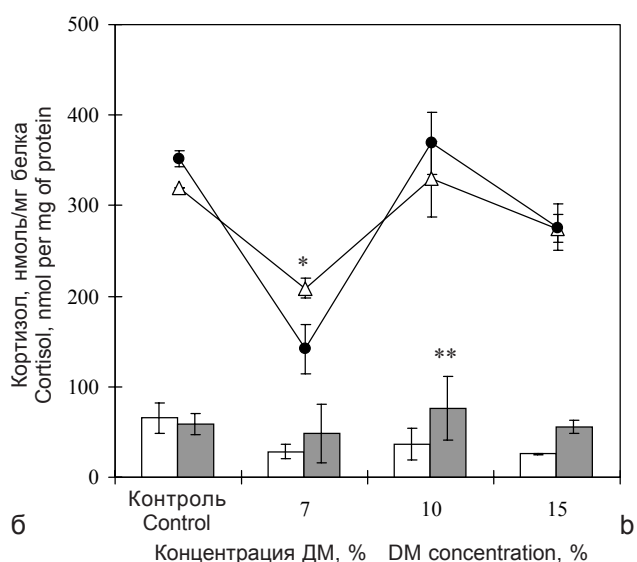
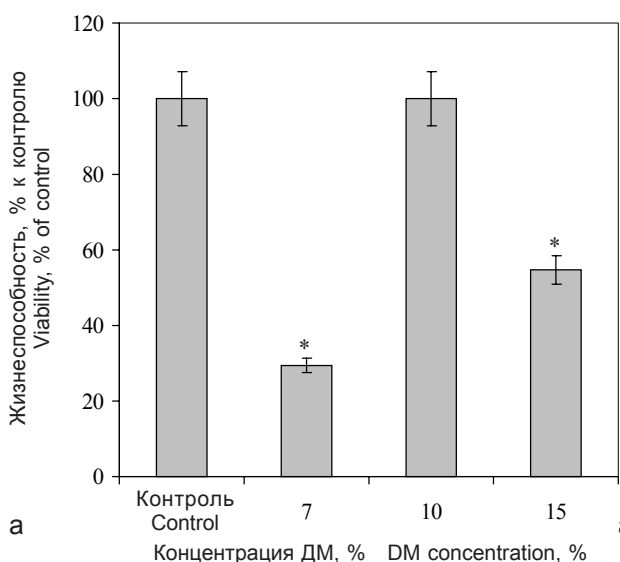


Рис. 2. Влияние замораживания со скоростью >100°C/мин с использованием различных концентраций димексида на жизнеспособность (а) и на базальный и дибутирил цАМФ-стимулированный стероидогенез (б) фрагментов надпочечных желез новорожденных поросят. * – различия достоверны по отношению к контролю, P<0,05; ** – различия достоверны по отношению к соответствующим значениям без стимуляции дибутирил цАМФ, P<0,05; на рисунке б: □ – гомогенат; ■ – гомогенат + дибутирил цАМФ; —△— – среда; —●— – среда + дибутирил цАМФ.

Fig. 2. Effect of freezing with the rate of >100C/min using various dimexide concentrations on the viability (a) and basal and dibutiryl cAMP-stimulated steroidogenesis (b) of adrenal gland fragments of newborn piglets; * – differences are statistically true in respect of the control, P<0.05; ** – differences are statistically true in respect of the corresponding values with no dibutiryl cAMP stimulation, P<0.05; on Fig. b: □ – homogenate; ■ – homogenate + dibutiryl cAMP; —△— – medium; —●— – medium + dibutiryl cAMP.

почечников новорожденных поросят не отвечают повышением секреции гидрокортизона на добавление в среду инкубации дибутирил цАМФ (рис. 2,б). Лишь в образцах, криоконсервированных с 10%-м ДМ, отмечено увеличение внутриклеточного содержания гидрокортизона.

Чтобы проверить, осуществляется ли вообще регуляция гормонами секреторной активности криоконсервированных Фр, измеряли секрецию кортизола при действии тироксина, который влияет на активность надпочечных желез [10]. Для данного исследования мы использовали Фр надпочечников, криоконсервированных в режиме [4], который обеспечивал жизнеспособность и гормонопродуцирующую активность на уровне 75% от исходного состояния.

Из рис. 3 видно, что добавление тироксина в среду инкубации приводит к концентрационно зависимому увеличению секреции кортизола криоконсервированными Фр надпочечников новорожденных поросят.

Результаты, полученные в данной работе, свидетельствуют о том, что межклеточные взаимодействия влияют на функциональные характеристики клеток надпочечников. Так, способность синтезировать и секретировать глюкокортикоидные гормоны характерна для адренокортикальных клеток, культивируемых как в виде СК, так и Фр.

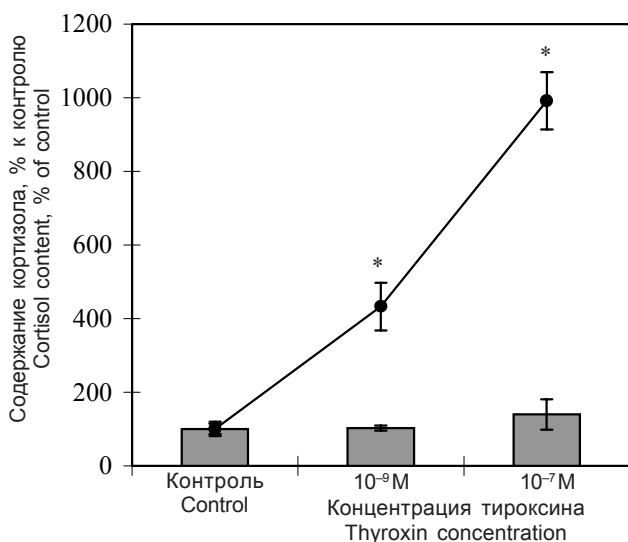


Рис. 3. Влияние тироксина на содержание кортизола в среде инкубации и гомогенатах клеток криоконсервированных фрагментов надпочечников новорожденных поросят. * – различия достоверны по отношению к контролю, $P < 0,05$); ■ – контроль; ● – среда инкубации.

Fig. 3. Thyroxine effect on a cortisol content in the incubation medium and cell homogenates of cryopreserved adrenal gland fragments of newborn piglets; * – differences are statistically true in respect of the control, $P < 0.05$; ■ – control; ● – incubation medium.

by using 7-15% DM as a cryoprotectant. The data presented in Fig. 2 testify the cryopreserved Fr cells of adrenal glands derived from newborn piglets to keep a high viability (Fig. 2a) and hormone producing activity which does not differ upon the initial one, when using 10% DM (Fig. 2b).

Cryopreservation with lower (7%) and higher (15%) DM concentration resulted in the reduction of the number of viable cells following thawing. Negative effect of the use of 15% DM may be related both to the cytotoxic effect of cryoprotectant and critical changes of cell volume when adding and removing the hypertonic solution. The latter fact seems more evident, especially when referring to our data that the adding-removal of 15% DM solution results in a sharp fall of CS viability of both mice and newborn piglets (Fig. 1). Absence of the manifested cryoprotecting effect of 7% DM if compared with 10% solution, is thought to be caused by the fact that a 5-min incubation at 22°C under such a cryoprotectant's concentration is not efficient for the optimum cell saturation with a cryoprotective substance [2].

One of the most important characteristics of adrenocortical cells is known to be their capability of increasing cortisol secretion under the effect of specific stimulators (ACTH) and non-specific ones (dibutiryl cAMP). Unlikely to CS, both native and cryopreserved adrenal gland Fr of newborn piglets do not respond to the addition into incubation medium of dibutiryl cAMP by the hydrocortisone secretion increase (Fig. 2b). Only in the samples cryopreserved with 10% DM there was noted the increase of intracellular hydrocortisone content.

To check whether the regulation by hormones of cryopreserved Fr secretory activity, we measured the cortisol secretion under the effect of thyroxine, which affects the adrenal gland activity [10]. For this investigation we used adrenal gland Fr cryopreserved according to the regimen [4] which provided the viability and hormone-producing activity at the level of 75% of the initial state.

As the Fig.3 demonstrates that thyroxine addition to the incubation medium results in the concentration-dependent increase of cortisol secretion by cryopreserved adrenal gland Fr of newborn piglets.

The results obtained in the work prove the fact that intercellular interactions affect cell functional characteristics of adrenal glands. Thus the capability of synthesizing and secreting the glucocorticoid hormones is characteristic for adrenocortical cells, cultured both as CS and Fr. However the stimulation of secretory activity under the effect of dibutiryl cAMP was noted only for single cells.

Activating effect of dibutiryl cAMP is realized through its influx in a cell by diffusion and following protein kinase activation, while the effect of thyroid

Однако стимуляция секреторной активности под влиянием дибутирил цАМФ была отмечена только для одиночных клеток.

Известно, что активирующее воздействие дибутирил цАМФ реализуется через его поступление путем диффузии в клетку и последующую активацию мембраносвязанной протеинкиназы, тогда как эффект тиреоидных гормонов осуществляется путем связывания с ядерными, цитоплазматическими и мембранно-связанными рецепторами клеток-мишеней. Так как способность связывать тироксин была показана для аполипопротеина Е [8], то стимулирующий эффект физиологических концентраций тироксина на секрецию кортизола криоконсервированными Фр, по-видимому, связан с увеличением поступления холестерина – субстрата для синтеза стероидных гормонов. Это также свидетельствует о том, что в процессе криоконсервирования сохраняется морфологическая и функциональная активность систем, облегчающих интернализацию липопротеинов.

Известно, что предобработка ДМ и собственно замораживание-отогрев изменяют активность ряда ферментных систем: неспецифически активируют аденилатциклазу адренокортикальных клеток [9], ингибируют секрецию прогестерона, стимулированную тропными гормонами гипофиза или дибутирил цАМФ [12]. Наши исследования показали, что предобработка ДМ в 5%-й концентрации увеличивает секрецию кортизола СК новорожденных поросят, но количество жизнеспособных клеток резко уменьшается при удалении криопротектора.

Хотя жизнеспособность СК после инкубации с дибутирил цАМФ остается неизменной, отмеченное накопление кортизола в инкубационной среде может быть обусловлено неспецифическим выбросом гормона из клеток в среду инкубации. Но, так как адренокортикальные клетки не способны к накоплению вновь синтезированного гидрокортизона во внутриклеточных компартаментах, а специфический транспорт холестерина сохраняется даже в пермеабелизованных клетках [11], нельзя исключить возможность стимуляции стероидогенной активности сохранившихся жизнеспособных клеток. Она может быть обусловлена как влиянием собственно ДМ, так и объемными изменениями клеток при осмотическом воздействии на внутриклеточный транспорт холестерина.

Выводы

Таким образом, проведенные исследования показывают, что сохранение морфологической целостности и межклеточных контактов во фрагментах надпочечных желез повышает их

hormones is done by binding with nucleated, cytoplasmic and membrane-bound cell-target receptors. As the capability to bind thyroxin was proved for apolipoprotein E [8], the stimulating effect of thyroxin physiological concentrations on cortisol secretion by cryopreserved Fr is thought to be connected with the increase of cholesterol influx, as a substrate for steroid hormone synthesis. This also testifies that during cryopreservation there remained morphological and functional activity of the systems, making easier the lipoproteins internalization.

DM pretreatment and freeze-thawing itself are known to alter the activity of the series of enzyme systems: to activate non-specifically the adenylate cyclase of adrenocortical cells [9], inhibit progesterone secretion stimulated by tropic hormones of hypophysis or dibutiryl cAMP [12]. Our investigations demonstrated the 5% DM pre-treatment to increase CS cortisol secretion of newborn piglets, but the amount of viable cells to fall dramatically during the cryoprotectant removal.

Although the CS viability following the incubation with various DM concentration remains unchanged the cortisol accumulation noted in the incubation medium may be stipulated by non-specific hormone release out of cells into an incubation medium. As adrenocortical cells are not capable of accumulating *de novo* synthesized hydrocortisone in intracellular compartments, and specific cholesterol transport remains in permeabilized cells as well [11], we should not exclude the possibility of steroidogenic activity stimulation of the preserved viable cells. It may be caused both by the effect of DM itself and cell volumetric changes under the osmotic effects on an intracellular cholesterol transport.

Conclusions

Thus the investigations accomplished demonstrate that keeping the morphological integrity and intercellular contacts in adrenal gland fragments increases their stability to the effect of low temperature preservation factors, by providing the maintenance of both basal and stimulated steroidogenesis. Diffuse barrier increase when culturing the fragments was shown not to affect the regulation, accomplished via binding with the receptors directed to an extracellular space.

References

1. Bondarenko T.P., Legach E.I. Secreting ability of adrenocortical tissue of newborn and mature pigs under low temperature effect // Problems of Cryobiology.– 1998.– N2.– P. 50-54.
2. Gordienko E.A., Pushkar N.S. Physical backgrounds for low temperature preservation of cell suspensions.– Kiev: Naukova Dumka, 1994.– 142 p.

устойчивость к действию факторов низкотемпературного консервирования, обеспечивая сохранение как базального, так и стимулированного стероидогенеза. Возрастание диффузионного барьера при культивировании фрагментов, хотя и изменяет их чувствительность к действию стимуляторов, эффективных при взаимодействии с внутриклеточными мишенями, но не влияет на регуляцию, осуществляемую через связывание с рецепторами, ориентированными во внеклеточное пространство.

Литература

1. Бондаренко Т.П., Легач Е.И. Секретирующая способность адренокортикальной ткани новорожденных и половозрелых свиней при действии низких температур // Пробл. криобиологии.– 1998.– №2.– С. 50-54.
2. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий.– Киев: Наук. думка, 1994.– 142 с.
3. Лимфоциты. Методы //Под ред Дж. Клауса; Пер с англ.– М.: Мир, 1990.– 395 с.
4. Пат. України № 99073996. Спосіб криоконсервування культури клітин адренокортикальної тканини/ Т.П. Бондаренко, Є.І. Легач.– Заявлено 09.12.99; Опубл. 15.03.2001. Бюл. №2.– 5 с.
5. Benvenega S., Cahnmann H.J., Robbins J. Characterization of thyroid hormone binding to apolipoprotein-E: localization of the binding site in the exon 3-coded domain // Endocrinology.– 1993.– Vol 133.– P. 1300-1305.
6. Ehrhart–Bornstein M, Hinson J.P., Bornstein S.R., et al. Intraadrenal interaction in the regulation of adrenocortical steroidogenesis // Endocrine Reviews.– 1998.– Vol. 19, N2.– P. 101-143.
7. Haidan A., Bornstein S.R., Glasow A. et al. Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells // Endocrinology.– 1998.– Vol 139.– P. 772-780.
8. Hines G.A., Azziz R. Impact of architectural disruption on adrenocortical steroidogenesis in vitro // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1999.– Vol. 84.– P. 1017-1021.
9. Karpenko L.G., Gubina N.F., Schirova V.A., Kaprelyants A.S. The effects of freezing and cryoprotectant exposure on adenylate cyclase activity in cell membranes of bovine thyroid gland and adrenal cortex // CryoLetters.– 2001.– Vol. 22, N4.– P. 229-234.
10. Lo M.J., Kau M.M., Chen Y.H. et al. Acute effects of thyroid hormones on the production of adrenal cAMP and corticosterone in male rats // Am. J. Physiol.– 1998.– Vol. 274.– P. E238-E245.
11. Reaven E, Tsai L., Azhar S. Intracellular events in the “selective” transport of lipoprotein-derived cholesteryl esters // J. Biol. Chem.– 1996.– Vol. 271, N27, P. 16208-16217.
12. Stocco D.M., King S., Clark B.J. Differential effects of dimethylsulfoxide on steroidogenesis in mouse MA-10 and rat R2C Leydig tumor cells // Endocrinology.– 1995.– Vol. 136.– P. 2993-2999.
3. *Lymphocytes: A practical approach.* Transl. From English/ Ed. by G.G. Klaus.– Moscow: Mir.– 1990.– 396 p.
4. *Patent of Ukraine N99073996.* Cryopreservation method for adrenocortical tissue cell culture. Bondarenko T.P., Legach E.I.– Accepted in 09.12.99; Issued in 15.03.2001. Bul. N2.– 5 p.
5. Benvenega S., Cahnmann H.J., Robbins J. Characterization of the thyroid hormone binding to apolipoprotein-E: localization of the binding site in the exon 3-coded domain // Endocrinology.– 1993.– Vol 133.– P. 1300-1305.
6. Ehrhart–Bornstein M, Hinson J.P., Bornstein S.R., et al. Intraadrenal interaction in the regulation of adrenocortical steroidogenesis // Endocrine Reviews.– 1998.– Vol. 19, N2.– P. 101-143.
7. Haidan A., Bornstein S.R., Glasow A. et al. Basal steroidogenic activity of adrenocortical cells is increased 10-fold by coculture with chromaffin cells // Endocrinology.– 1998.– Vol. 139.– P. 772-780.
8. Hines G.A., Azziz R. Impact of architectural disruption on adrenocortical steroidogenesis in vitro // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 1999.– Vol. 84.– P. 1017-1021.
9. Karpenko L.G., Gubina N.F., Schirova V.A., Kaprelyants A.S. The effects of freezing and cryoprotectant exposure on adenylate cyclase activity in cell membranes of bovine thyroid gland and adrenal cortex // CryoLetters.– 2001.– Vol. 22, N4.– P. 229-234.
10. Lo M.J., Kau M.M., Chen Y.H. et al. Acute effects of thyroid hormones on the production of adrenal cAMP and corticosterone in male rats // Am. J. Physiol.– 1998.– Vol. 274.– P. E238-E245.
11. Reaven E, Tsai L., Azhar S. Intracellular events in the “selective” transport of lipoprotein-derived cholesteryl esters // J. Biol. Chem.– 1996.– Vol. 271, N27, P. 16208-16217.
12. Stocco D.M., King S., Clark B.J. Differential effects of dimethylsulfoxide on steroidogenesis in mouse MA-10 and rat R2C Leydig tumor cells // Endocrinology.– 1995.– Vol. 136.– P. 2993-2999.

Accepted in 20.04.2004

Поступила 20.04.2004