

УДК 57.084:547.569.2

В.Е. ЧАДАЕВ

Влияние димексида на функциональные характеристики тестикулярной ткани кроликов

UDC 57.084:547.569.2

V.E. CHADAEV

Effect of Dimexide on Functional Characteristics of Rabbit Testicular Tissue

Изучено влияние криопротектора димексида на функциональные характеристики тестикулярной ткани кроликов. Установлено, что низкие концентрации димексида усиливают действие стимуляторов стероидогенеза, а более высокие – ингибируют.

Ключевые слова: кролики, димексид, тестикулярная ткань.

Вивчено вплив криопротектора димексиду на функціональні характеристики тестикулярної тканини кролів. Встановлено, що невеликі концентрації димексиду підсилюють дію стимуляторів стероїдогенезу, а більш великі – інгібують.

Ключові слова: кролі, димексид, тестикулярна тканина.

The effect of dimexide cryoprotectant on functional characteristics of rabbit testicular tissue has been studied. It has been established that the low concentrations of dimexide strengthen the effect of steroidogenesis stimulators, but the higher ones inhibit.

Keywords: rabbits, dimexide, testicular tissue.

Эндокринные ткани обладают повышенной чувствительностью к действию ишемических повреждающих факторов [8, 17]. Данное свойство эндокринных тканей определяет выбор криопротектора. В исследованиях в качестве криопротектора использовали фармакопейный препарат диметилсульфоксида – димексид (ДМ), который быстро проникает через клеточные мембраны и обладает мощным противоишемическим действием [8, 14, 19]. Экспериментальные данные [2–4, 6, 7, 11–13, 15, 16, 20, 24] подтверждают полученные результаты использования ДМ в качестве криопротектора при замораживании эмбриональных тестисов человека [9], органотипических культур из надпочечников [10] и щитовидной железы неонатальных тканей суточных поросят [3].

Цель работы – изучить влияние ДМ на функциональные характеристики тестикулярной ткани кроликов.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на 18-месячных кроликах породы Шиншилла массой 3000–3500 г в соответствии с “Общими принципами экспериментов на животных”, одобренными II Национальным

Endocrine tissues have hypersensitivity to the action of ischemic damaging factors [8, 17]. This feature of endocrine tissues determines a cryoprotectant selection. The pharmacopeial preparation of dimethyl sulfoxide, dimexide (DM), which is utilized as cryoprotectant rapidly penetrating through cell membranes was reported to as has a high anti-ischemic action [8, 14, 19]. Experimental data [2–4, 6, 7, 11–13, 15, 16, 20, 24] show the successful using of DM as cryoprotectant at freezing of human fetal testes [9], organotypic cultures from adrenal glands [10] and thyroid gland of one day piglets' neonatal tissues [3].

The research aim was to study the effect of DM on functional characteristics of rabbits' testicular tissue.

Materials and methods

The experiments were carried out in 18 months' old Chinchilla rabbits of 3000–3500 g, according to the “General principles of experiments in animals”, approved by the II National Congress on Bioethics (20.09.01, Kiev, Ukraine) and agreed with the statements of the “European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes” (Strasbourg, 1985). During

Институт проблем криобиологии и криомедицины
НАН Украины, г. Харьков

* Автор, которому необходимо направлять корреспонденцию:
ул. Перейславская, 23, г. Харьков, Украина 61015; тел.: +38
(057) 373-31-19, факс: +38 (057) 373-30-84, электронная почта:
cryo@online.kharkov.ua

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

* To whom correspondence should be addressed: 23, Pereyaslavskaya str., Kharkov, Ukraine 61015; tel.: +380 57 373 3119, fax: +380 57 373 3084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

конгрессом по биоэтике (20.09.04, Киев, Украина) и согласованными с положениями “Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей” (Страсбург, 1985). Во время эксперимента животных содержали в стандартных условиях при 15–17°C (1,5 месяца), наблюдая за их состоянием.

Тестисы после экстирпации помещали в охлажденный стерильный физиологический раствор, измельчали на фрагменты 1–2 мм и отмывали от крови при 3-кратной замене раствора равными объемами раствора Хенкса. Показатели полученных на данном этапе исследований фрагментов ткани далее считали контрольными величинами.

Микрофрагменты тестисов инкубировали 30 мин при разных концентрациях ДМ и температуре 0 или 37°C. Экстракт гипофиза (ЭГ) получали по методике [4]. Содержание тестостерона определяли с помощью полимеразной цепной реакции до начала инкубации и после гомогенизации микрофрагментов, затем нормировали на 1 г ткани. Перед измельчением ткань взвешивали с точностью до 4-го знака. Равные навески ткани помещали в раствор Хенкса (0 или 37°C) с разными концентрациями ДМ, затем на водяную баню при соответствующих температурах. Время фиксировали с момента введения раствора. После инкубации определяли содержание тестостерона в надосадке. Образцы центрифугировали 15 мин при 3000 об/мин. Осадок ресуспендировали в том же объеме раствора Хенкса, гомогенизировали и определяли уровень тестостерона. Жизнеспособность клеток определяли колориметрическим методом [4].

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента-Фишера с помощью программного обеспечения Excel и Sigmaplot.

Результаты и обсуждение

При работе с эндокринными тканями следует учитывать, что криопротекторы значительно влияют на секреторные способности эндокринных клеток, причем относительно невысокие концентрации криопротекторов могут вызывать необратимые изменения в эндокринных клетках на фоне сохранения их морфологической структуры [14]. Например, для органотипической культуры из надпочечников новорожденного поросенка предельно допустимая концентрация ДМ, которая не вызывает необратимых изменений в секреторной способности этих клеток – 5% [10], а для культур из щитовидной железы – 7% [3]. Поскольку клетки семенников более чувствительны к действию повреждающих факторов, реализующихся при

the experiment (1.5-month) animals were kept under standard conditions at 15–17°C with monitoring of their state.

After extirpation the testes were placed into cooled sterile physiological solution, cut into 1–2 mm fragments and washed-out of blood with 3-fold change of solution with equal volume of Hank’s solution. The characteristics of obtained at this stage of investigation tissue fragments served as control values.

Microfragments of testes were incubated for 30 min at various concentrations of DM at either 0 or 37°C. Hypophysis extract (HE) was obtained using the method [4]. Testosterone content was determined with PCR method prior to incubation and after microfragments’ homogenization, then normalized per 1 g of tissue. Prior to dissection the tissue was weighted within the accuracy of 4th figure. The equal tissue sections were placed into Hank’s solution (0 or 37°C) at different DM concentrations, and then on water bath at corresponding temperatures. Time was recorded immediately after introduction the solution. After incubation a content of testosterone in supernatant was determined. The samples were centrifuged for 15 min at 3000 rpm. The supernatant was resuspended in the same volume of the Hank’s solution, homogenized and testosterone level was determined. Cell viability was determined with calorimetric method [4].

Statistical processing of results was carried out by the Student-Fisher’s method with Excel and Sigmalot software.

Results and discussion

During the work with endocrine tissues one should consider the fact, that the cryoprotectants significantly affect the secreting ability of endocrine cells, moreover relatively low cryoprotectants’ concentrations may induce irreversible changes in endocrine cells on the background of preserving their morphological structure [14]. For example, for organotypic culture from adrenal glands of newborn piglets the maximum allowable DM concentration, not inducing irreversible changes in secreting ability of these cells is 5% [10], and for the cultures from thyroid gland is 7% [3]. Whereas the cells the of testes are more sensitive to the effect of damaging factors, realizing at temperature decrease [9, 13], it is expedient to carry out the experiments under higher concentrations (5–15%).

Studied rabbits’ testicular tissue contained 320 ± 17 ng/g of testosterone. Microfragments of testicular tissue (1–2 mm), placed into Hank’s solution in 1:4 ratio W/W and containing various DM concentrations were incubated for 30 min at 0 or 37°C. After incubation the testosterone concentration in tissue and incubated medium was determined (Fig. 1, a).

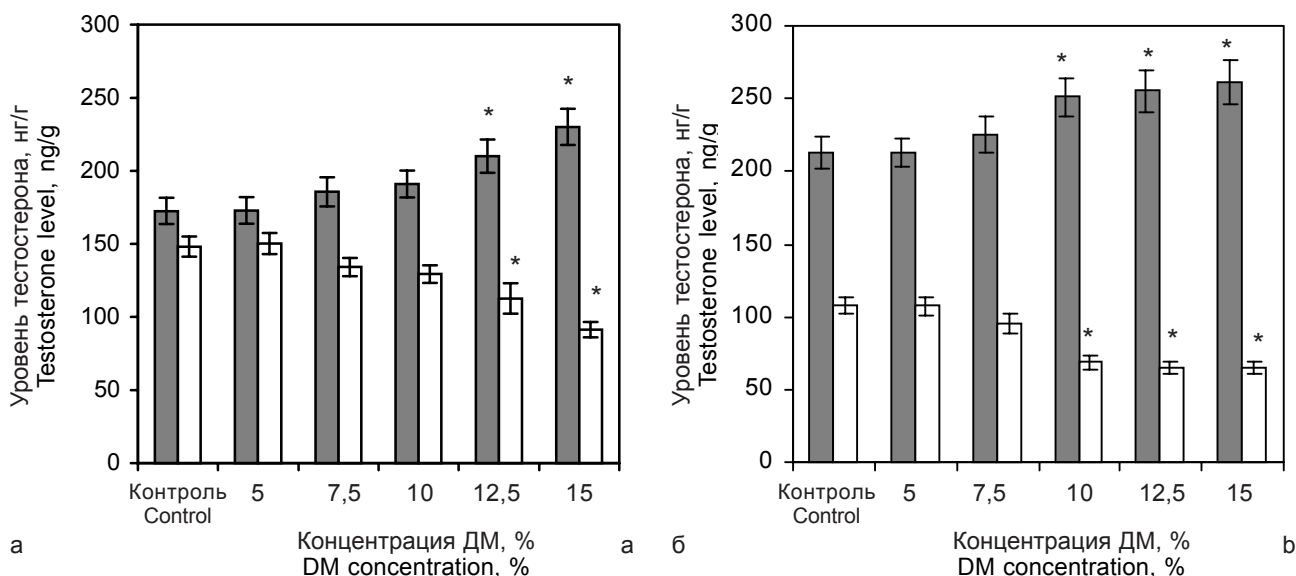


Рис. 1. Влияние инкубации при 37°C (а) и при 0°C (б) с различными концентрациями ДМ на уровень секреции тестостерона и его содержание в тестикулярной ткани (n = 6): ■ – тестостерон в ткани; □ – тестостерон в среде; * – результаты достоверны относительно контроля, P < 0,05.

Fig. 1. Effect of incubation at 37 (a) and 0°C (b) with different DM concentrations on testosterone secretion level and its content in testicular tissue (n = 6): ■ – testosterone in tissue; □ – testosterone in medium; * – results are significant as for the control, P < 0.05.

снижении температур [9, 13], целесообразно проводить эксперименты при более высоких концентрациях (5–15%).

Исследуемая тестикулярная ткань кроликов содержала 320 ± 17 нг/г тестостерона. Микрофрагменты тестикулярной ткани (1–2 мм), помещенные в раствор Хенкса в соотношении 1:4 по весу и содержащие разные концентрации ДМ, инкубировали 30 мин при 0 или 37°C. После инкубации определяли концентрацию тестостерона в ткани и инкубационной среде (рис. 1, а).

В клетках фрагментов тестикулярной ткани кроликов при концентрации ДМ 5% уровень тестостерона в клетках и инкубационной среде не изменялся. При повышении концентрации криопротектора до 7,5% в инкубационной среде наблюдалось снижение перераспределения тестостерона между тканью и инкубационной средой, однако оно было недостоверным. Дальнейшее повышение концентрации ДМ сопровождалось достоверным снижением уровня перераспределения тестостерона в среду инкубации. Перераспределение гормона при концентрации ДМ 10% снижалось на 14%, при 12,5% – на 25% и 15% – на 40%. Уровень тестостерона в инкубационной среде снижался на фоне повышения его уровня в клетках.

На основании полученных результатов можно сделать вывод, что увеличение концентрации ДМ в инкубационной среде влияло на секрецию гормона и не влияло на его синтез.

Результаты инкубации микрофрагментов тестикулярной ткани в присутствии ДМ при 0°C пред-

The testosterone level in cells and incubated medium did not change in cells of rabbits' testicular tissue fragments under 5% DM concentration. When increasing the cryoprotectant concentration up to 7.5%, the decrease of testosterone redistribution between tissue and incubated medium was observed in incubated medium, but it was insignificant. Further increase of DM concentration was accompanied with significant reduction of testosterone redistribution level in the incubation medium. Hormone redistribution under 10% DM concentration was reduced down to 14%, under 12.5% down to 25% and under 15% down to 40%. The testosterone level in incubated medium was decreased on the background of increase of its level in cells.

The obtained results allowed to conclude that increase of DM concentration in incubated medium affected hormone secretion and did not affect its synthesis.

The results of testicular tissue microfragments' incubation in the DM presence at 0°C are shown in Fig. 1, b. Incubation of testicular tissue with cryoprotectant at 0°C results in change of hormones' redistribution between cells and incubated medium, as well as at 37°C. However, these changes are less expressed at 0°C, that is probably due to the slowing of all processes in cells at low temperature effect. In addition, there is stabilization of plasmatic membrane cytoskeleton proteins at 0°C, which may affects on hormones' secretion.

It is known that all steroid hormones in mammals are synthesized from cholesterol at serial reactions [15]. Under the effect of cAMP esterase the activation

ставлены на рис. 1, б. Инкубация тестикулярной ткани с криопротектором при 0°C приводит к изменению перераспределения гормонов между клетками и инкубационной средой, как и при 37°C. Однако при 0°C эти изменения менее выражены, что, вероятно, обусловлено замедлением всех процессов в клетках при действии низких температур. Кроме того, при 0°C имеет место стабилизация белков цитоскелета плазматических мембран, которая может влиять на секрецию гормонов.

Известно, что у млекопитающих все стероидные гормоны синтезируются из холестерина при последовательных реакциях [15]. Под действием цАМФ происходит активация эстеразы, а образующийся в результате ее активации свободный холестерин транспортируется к месту синтеза стероидных гормонов. Возможно, 5- и 10%-е концентрации ДМ способствуют активации эстеразы и быстрому запуску биосинтеза стероидных гормонов, в результате которых усиливается секреция тестостерона (рис. 2). При 0°C эстераза не активируется, поскольку указанная температура не является физиологической, а ее действие приводит к замедлению всех биологических процессов. В виду отсутствия данных относительно регуляции процессов секреции тестикулярных гормонов, мы полагаем, что тестостерон, как и другие стероидные гормоны, секретирется по мере образования. В случае более высоких концентраций криопротектора (12,5 и 15%), вероятно, активация эстеразы отсутствует или даже ингибируется, т.е. стероидогенез может замедляться.

Снижение уровня перераспределяемых гормонов в инкубационную среду можно объяснить гибелью части клеток под влиянием ДМ. При определении количества жизнеспособных клеток колориметрическим методом с использованием трипанового синего установлено, что после инкубации с криопротектором при 0 или 37°C оно не изменяется (рис. 2). Во всех исследуемых образцах количество жизнеспособных клеток составляло 72–74%. Гибель остальных клеток связана с дезинтеграцией кусочков ткани на отдельные клетки после обработки трипсином. При определении жизнеспособности клеток с помощью колориметрического метода данная процедура обязательна.

Поскольку тестостерон синтезируется только клетками Лейдига, а количество жизнеспособных клеток при инкубации с криопротектором не изменялось, то полученные данные о снижении содержания перераспределенного между клеткой и средой гормона в присутствии концентраций ДМ 7,5–15% можно объяснить нарушением процессов секреции.

takes place and free cholesterol, resulting from its activation is transported to the steroid hormones synthesis site. Perhaps, 5 and 10% DM concentrations make possible the esterase activation and rapid initiation of steroid hormones' biosynthesis, due to those the testosterone secretion is increased (Fig. 2). Esterase is not activated at 0°C, because this temperature is not physiological and its activity results into slowing-down all biological processes. Because of the absence of data as for regulation of testicular hormones secretion processes, we suppose that testosterone, as other steroid hormones is secreted along its formation. At higher concentrations of cryoprotectant (12.5 and 15%), probably the esterase activation is absent or even inhibited, i.e. steroidogenesis may be slowed-down moderate.

Increase of redistributed hormone level into incubation medium one may explain with the death of cells' part under DM effect. When determining a number of viable cells by calorimetric method with using trypan blue it has been established that after incubation with cryoprotectant at 0 or 37°C it does not change (Fig. 2). In all the studied samples the number of viable cells consisted 72–74%. Death of other cells has been associated to disintegration of tissue samples into certain cells after trypsin treatment. When determining the viability of cells with calorimetric method this procedure was compulsory.

As testosterone is synthesized only with Leydig's cells and the number of viable cells during incubation with cryoprotectant did not change, therefore the

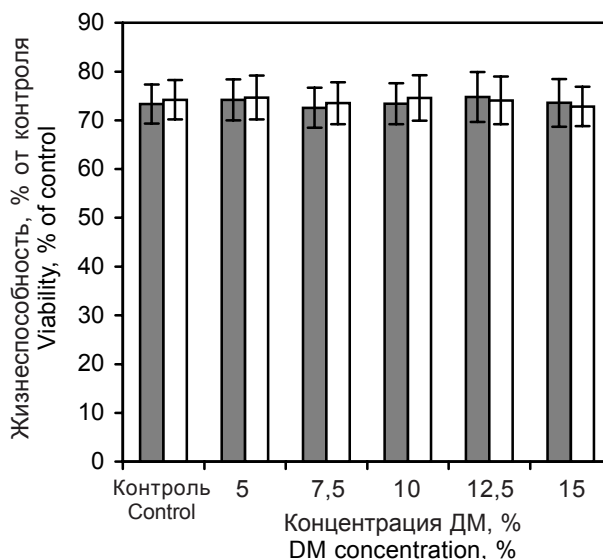


Рис. 2. Количество жизнеспособных клеток в микрофрагментах тестикулярной ткани кроликов до и после инкубации с ДМ (n = 6): ■ – 37° С, 30 мин; □ – 0° С, 30 мин.

Fig. 2. Number of viable cells in microfragments of rabbit testicular tissue prior to and after incubation with DM (n = 6): ■ – 37° С, 30 min; □ – 0° С, 30 min.

Тестостерон относится к гормонам липофильной группы, рецепторы для которого расположены на внутренней поверхности мембраны [18, 21, 22]. Вероятно, проникающий в клетки ДМ может изменять состояние компонентов и, в частности, участков мембраны, среди которых участки, включающие рецепторы для тестостерона. В связи с этим мы считали целесообразным исследовать поведение клеток тестикулярной ткани при действии на них специфических модификаторов стероидогенеза гликопротеиновых гормонов гипофиза: гонадотропинов, фолликулостимулирующего гормона (ФСГ), лютеинизирующего гормона (ЛГ). Известно, что ЛГ, связываясь со специфическими рецепторами клеток, стимулирует образование тестостерона в клетках Лейдига [17, 18]. Подобным эффектом обладает хориальный гонадотропин [23]. По мнению большинства исследователей, ФСГ участвует в транспорте тестостерона и усиливает функцию ЛГ. В качестве стимуляторов стероидогенеза мы использовали 10%-й ЭГ, конечная концентрация которого в инкубационной среде составляла 10 мкл/мл. В работе [1] показано, что применение более высоких концентраций сопровождается меньшим стимулирующим эффектом (рис. 3). Клетки тестикулярной ткани без криопротектора реагировали на введение ЭГ повышением уровня тестостерона в среде инкубации.

При введении в среду инкубации 5% ДМ уровень секреции тестостерона по сравнению с контрольными образцами повышался. Возможно, присутствие ДМ способствовало усилению стимулирующего эффекта ЭГ, такая же картина наблюдалась и в присутствии 7%-й концентрации данного криопротектора. Дальнейшее повышение концентрации ДМ в среде инкубации приводило к снижению стимулирующего влияния ЭГ, т.е. ингибированию стимулируемой секреции.

Выводы

Установлено, что ДМ существенно не влияет на жизнеспособность клеток тестикулярной ткани, однако его присутствие в среде изменяет функциональные характеристики ткани, а именно: малые концентрации ДМ (5–7%) усиливают действие стимуляторов стероидогенеза, более высокие (12–15%) – ингибируют, 10%-я концентрация занимает промежуточное место.

Поэтому в дальнейшем при разработке способа криоконсервирования тестикулярной ткани кролика мы использовали концентрации ДМ 7,5–10%.

Автор выражает благодарность зав. отделом криобиохимии и фармакологии нейрогуморальных систем ИПКиК НАН Украины д.б.н., профессору Т.П. Бондаренко за консультативную помощь в написании статьи.

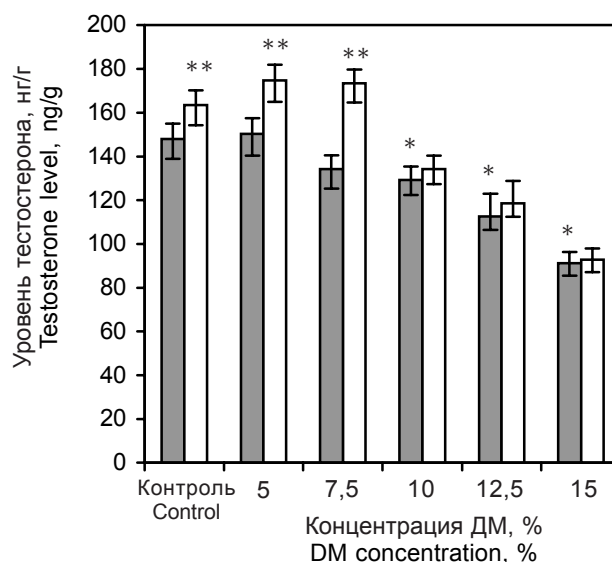


Рис. 3. Уровень тестостерона в среде инкубации при различных концентрациях криопротектора ДМ и после введения ЭГ (n = 6): ■ – без ЭГ; □ – в присутствии ЭГ, 30 мин; * – различия достоверны относительно контроля, P < 0,05; ** – различия достоверны относительно данных для образцов без введения ЭГ, P < 0,05.

Fig. 3. Testosterone level in incubation medium under different concentrations of DM cryoprotectant and after HE introduction (n = 6): ■ – without HE; □ – 30 min after introduction of HE; * – differences are statistically significant comparing to the control, P < 0.05; ** – differences are statistically significant comparing to the data of samples without HE introduction, P < 0.05.

obtained data about the decrease of redistributed content between cell and hormone medium in the presence of 7.5–15% DM concentrations one may explain with impaired secretion processes.

Testosterone is a hormone of lipophilic group, for which the receptors are placed on inner surface of membrane [18, 21, 22]. It is possible that penetrating DM into cells may change its state and particularly, membrane areas, among which there are those, comprising the receptors for testosterone. Therefore, we considered as expedient to study the behavior of testicular tissue cells during the effect on them of specific steroidogenesis modifiers of glycoprotein hormones of hypophysis, such as gonadotropins, follicle stimulating hormone (FSH), luteinizing hormone (LH). It is known that LG, binding with specific receptors of cells stimulates the testosterone formation in the Leydig's cells [17, 18]. Same effect has a choriogonadotropin [23]. According to the majority of researches FSH takes a part in testosterone transport and stimulates LH. As the stimulators of steroidogenesis we used 10% HE, which final concentration was 10 ml/ml. It has been shown in the work that using higher concentrations is accompanied with less stimulating effect (Fig. 3). Cells of testicular tissue without cryoprotectant respond to introduction of HE by the increase of testosterone level in incubation medium.

Литература

1. *Адамс Р.* Методы культур клеток для биохимиков.—М.: Мир, 1983.— 263 с.
2. *Белоус А.М., Бондаренко В.А.* Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.— Киев: Наук. думка, 1985.— 257 с.
3. *Бондаренко Т.П., Волкова Н.А., Луговой С.В.* Уровень тиреоидных гормонов в плазме кроликов при ксено-трансплантации криоконсервированной органной культуры щитовидной железы неонатальных поросят // Пробл. криобиологии.— 2001.— №3.— С. 41–42.
4. *Бондаренко Т.П., Волкова Н.А., Самченко И.И. и др.* Коориметрическое определение жизнеспособности органной культуры клеток надпочечников и щитовидной железы // Лабораторная диагностика.— 2001.— №4.— С. 43–48.
5. *Бондаренко Т.П., Кадникова Н.Г., Алабедалькарим Н.М. и др.* Сравнительное изучение жизнеспособности криоконсервированных культур эндокринных тканей новорожденных поросят // Пробл. криобиологии.— 2000.— №4.— С. 59–61.
6. *Гальченко С.Е.* Особенности криоконсервирования биологических объектов с применением больших скоростей охлаждения: Автореф. дис. ... канд. биол. наук.— Харьков, 1990.— 16 с.
7. *Геращенко Г.В.* Функціональні характеристики органної культури надниркових залоз при криоконсервуванні та ксенотрансплантації: Автореф. ... дис. канд. біол. наук. — Харків, 2002.— 18 с.
8. *Грищенко В.И., Чуйко В.А., Пушкарь Н.С.* Криоконсервация тканей и клеток эндокринных органов.— Киев: Наук. думка, 1993.— 174 с.
9. *Карпенко Н.Г., Новиков А.Н., Олейник С.Т. и др.* Активность аденилатциклазы в адренортикальной ткани при различных режимах охлаждения с димексидом и пропандиолом // Пробл. криобиологии.— 1994.— №2.— С. 41–44.
10. *Керос В.А.* Криоконсервирование фетотестикулярной ткани человека: Дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 2001.— 132 с.
11. *Легащ Е.И.* Влияние криоконсервирования на адренортикальную ткань: Дис. ... канд. мед. наук.— Харьков, 1998.— 128 с.
12. *Линник Т.П., Грищенко В.И., Артеменко А.Б., Терещенко А.В.* Влияние длительного низкотемпературного хранения спермы петухов на ее оплодотворяющую способность // Пробл. криобиологии.— 2000.— №3.— С. 64–71.
13. *Сандомирский Б.П., Волкова Н.А., Гальченко С.Е., Белочкина И.В.* Влияние режимов криоконсервирования на сохранность микрофрагментов поджелудочной железы поросят // Пробл. криобиологии.— 2000.— №2.— С.76–80.
14. *Чуйко В.А.* Механизм криозащитной эффективности и фармакологические свойства ДМСО // Криобиология.— 1989.— №1.— С.3–10.
15. *Юрченко Г.Г., Чадаев В.Е., Чуб Н.Н., Лобынцева Г.С.* Использование амниотической оболочки для снижения иммунного ответа на аллотрансплантацию криоконсервированной ткани яичника // Тези І з'їзду Укр. т-ва криобіології і криомедицини.— Харків, 1995.— С. 283.
16. *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 // Cryo Letters.— 2001.— Vol. 22, N4.— P. 229–234.
17. *Malis C.D., Bonventre J.* Susceptibility of mitochondrial membranes to calcium and reactive oxygen species: implication for ischemic and toxic tissue damage // Prog. Clin. Biol. Res.— 1988.— Vol. 282.— P. 235–259.
18. *Manna P.R., Tena-Sempere M., Huhtaniemi I.T.* Molecular mechanisms of thyroid hormone-stimulated steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. Involvement of the steroidogenic

When adding into incubation medium 5% of DM the testosterone secretion level was increased in comparison with control samples. Probably, the DM presence stimulated the effect of HE, the same process was observed in the presence of 7% concentration of this cryoprotectant. Further increasing of DM concentration in incubation medium results in reducing of stimulating effect of HE, *i.e.* inhibition of stimulated secretion.

Conclusions

It has been established, that DM does not significantly affect the viability of testicular tissue cells, however its presence in medium changes functional characteristics of tissue, namely, low concentrations of DM (5–7%) strengthen the stimulators of steroidogenesis, higher ones (12–15%) inhibit and 10% concentration has a transitional location.

Therefore, during development of rabbit's testicular tissue cryopreservation method we used 7.5-10% DM concentrations.

The author acknowledges the Head of Department of Cryobiochemistry and Pharmacology of Neurohumoral Systems of IPC&C, Doctor of Biological Sciences, Professor Bondarenko T.P. for consultative assistance in manuscript preparation.

References

1. *Adams R.* Methods of cell cultures for biochemists.— Moscow: Mir, 1983.— 263 p.
2. *Belous A.M., Bondarenko V.A.* Structural changes of biological membranes during cooling.— Kiev: Naukova Dumka, 1985.— 257 p.
3. *Bondarenko T.P., Volkova N.A., Lugovoy S.V.* Thyroid hormone level in rabbits' blood plasma at xenotransplantation of cryopreserved organ culture of neonatal piglets' thyroid gland // Problems of Cryobiology.— 2001.— N3.— P. 41–42.
4. *Bondarenko T.P., Volkova N.A., Samchenko I.I. et al.* Calorimetric determination of organ culture viability of adrenal and thyroid glands cells// Laboratornaya Diagnostika.— 2001.— N4.— P. 43–48.
5. *Bondarenko T.P., Kadnikova N.G., Alabedalkarim N.M. et al.* Comparative study of cryopreserved cultures viability of newborn piglets' endocrine tissues// Problems of Cryobiology.— 2000.— N4.— P. 59–61.
6. *Galchenko S.E.* Characteristics of biological objects' cryopreservation with application of higher cooling rates: Abstract of authors thesis of Candidate of Biological Sciences.— Kharkov, 1990.— 16 p.
7. *Geraschenko G.V.* Functional characteristics of organ culture of adrenal glands at cryopreservation and xenotransplantation: Abstract of authors thesis of Candidate of Biological Sciences.— Kharkov, 2002.— 18 p.
8. *Grishchenko V.I., Chuyko V.A., Pushkar N.S.* Cryopreservation of tissues and cells of endocrine organs.— Kiev: Naukova Dumka, 1993.— 174 p.
9. *Karpenko N.G., Novikov A.N., Oleynik S.T. et al.* Activity of adenylate cyclase in adrenocortical tissue at different regimens of cooling with dimexide and propanediol // Problems of Cryobiology.— 1994.— №2.— P. 41–44.

- acute regulatory (StAR) protein // *J. Biol. Chem.*– 1999.– Vol. 274, N9.– P. 5909–5918.
19. *McGann L.E., Walterson M.L.* Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone // *Cryobiology.*– 1987.– Vol. 24, N1.– P. 11–16.
 20. *Pascual G., Garcia-Honduvilla N., Rodriguez M. et al.* Effect of the thawing process on cryopreserved arteries // *Ann. Vasc. Surg.*– 2001.– Vol. 15, N6.– P. 619–627.
 21. *Saez J.M.* Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation // *Endocr. Rev.*– 1994.– Vol. 15, N5.– P. 574–626.
 22. *Weber C., Pi-Sunyer F.X., Nilaver G., Reemtsma K.* Murine islet cryopreservation and corticosteroids: functional studies // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 20, N2.– P. 219–225.
 23. *Wilson J.D., Griffin J.E., George F.W., Leshin M.* The endocrine control of male phenotypic development // *Aust. J. Biol. Sci.*– 1983.– Vol. 36, N2.– P. 101–107.
 24. *US Patent N6361934* Method and apparatus for cryopreservation / *E. Acton, G.J. Morris.*– Filed 23.06.2000, Published 26.03.2002.
 10. *Keros V.A.* Cryopreservation of human fetotesticular tissue: Authors thesis of Candidate of Medical Sciences.– Kharkov, 2001.– 132 p.
 11. *Legach E.I.* Cryopreservation effect on adrenocortical tissue: Authors thesis of Candidate of Medical Sciences.– Kharkov, 1998.– 128 p.
 12. *Linnik T.P., Grischenko V.I., Artemenko A.B., Tereschenko A.V.* Effect of long-term low temperature storage of fowl spermatozoa on its fertilizing ability// *Problems of Cryobiology.*– 2000.– N3.– P. 64–71.
 13. *Sandomirsky B.P., Volkova N.A., Galchenko S.E., Belochkina I.V.* Effect of cryopreservation regimens on microfragments integrity of piglets' pancreas // *Problems of Cryobiology.*– 2000.– N3.– P. 64–71.
 14. *Chuyko V.A.* Mechanism of cryoprotective efficiency and pharmacological properties of DMSO // *Kriobiologiya.*– 1989.– №1.– P. 3–10.
 15. *Yurchenko G.G., Chadaev V.E., Chub N.N., Lobyntseva G.S.* Application of amnion for decreasing of immune reaction on allotransplantation of cryopreserved tissue of ovary // *Proceedings of the 1st Meeting of Ukrainian Society of Cryobiology and Cryomedicine.*– Kharkov, 1995.– P. 283.
 16. *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 // *Cryo Letters.*– 2001.– Vol. 22, N4.– P. 229–234.
 17. *Malis C.D., Bonventre J.* Susceptibility of mitochondrial membranes to calcium and reactive oxygen species: implication for ischemic and toxic tissue damage // *Prog. Clin. Biol. Res.*– 1988.– Vol. 282.– P. 235–259.
 18. *Manna P.R., Tena-Sempere M., Huhtaniemi I.T.* Molecular mechanisms of thyroid hormone-stimulated steroidogenesis in mouse Leydig tumor cells. Involvement of the steroidogenic acute regulatory (StAR) protein // *J. Biol. Chem.*– 1999.– Vol. 274, N9.– P. 5909–5918.
 19. *McGann L.E., Walterson M.L.* Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone // *Cryobiology.*– 1987.– Vol. 24, N1.– P. 11–16.
 20. *Pascual G., Garcia-Honduvilla N., Rodriguez M. et al.* Effect of the thawing process on cryopreserved arteries // *Ann. Vasc. Surg.*– 2001.– Vol. 15, N6.– P. 619–627.
 21. *Saez J.M.* Leydig cells: endocrine, paracrine and autocrine regulation // *Endocr. Rev.*– 1994.– Vol. 15, N5.– P. 574–626.
 22. *Weber C., Pi-Sunyer F.X., Nilaver G., Reemtsma K.* Murine islet cryopreservation and corticosteroids: functional studies // *Cryobiology.*– 1983.– Vol. 20, N2.– P. 219–225.
 23. *Wilson J.D., Griffin J.E., George F.W., Leshin M.* The endocrine control of male phenotypic development // *Aust. J. Biol. Sci.*– 1983.– Vol. 36, N2.– P. 101–107.
 24. *US Patent N6361934.* Method and apparatus for cryopreservation / *E. Acton, G.J. Morris.*– Filed 23.06.2000, Published 26.03.2002.

Поступила 26.02.2008
Рецензент А.В. Пахомов

Accepted in 26.02.2008