

УДК 615.361.014.4:57.085.1:577.175.53

UDC 615.361.014.4:57.085.1:577.175.53

**Влияние функционального состояния криоконсервированной
органной культуры надпочечников на гормональный статус
животных при ксенотрансплантации**

А.В. ГЕРАШЕНКО, Т.П. БОНДАРЕНКО

*Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков***Influence of Functional State of Cryopreserved Adrenal Gland Organ Culture
on Animals' Hormonal Status at Xenotransplantation**

GERASHCHENKO A.V., BONDARENKO T.P.

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

Заместительная кортикостероидная терапия является одной из форм лечения надпочечниковой недостаточности, причем трансплантация органных культур надпочечников считается наиболее физиологическим методом лечения данного синдрома [4, 5]. Успехи современной криобиологии позволяют длительно хранить эндокринный материал без существенной потери функциональных характеристик, что и обеспечивает его терапевтический эффект при трансплантации. Ксенотрансплантация (КТ) криоконсервированных органных культур надпочечников новорожденных поросят (КОКННП) между отдаленными видами (в нашем случае крысы и новорожденные поросята) может быть моделью для изучения как механизмов контроля стероидогенеза клетками ксенографта, так и сроков жизни криоконсервированного трансплантата в организме реципиента.

Цель данного исследования - изучение влияния различного функционального состояния КОКННП до трансплантации на компенсаторную роль трансплантата в организме реципиента, что прежде всего отражается на содержании 11-ОКС в плазме крови экспериментальных животных.

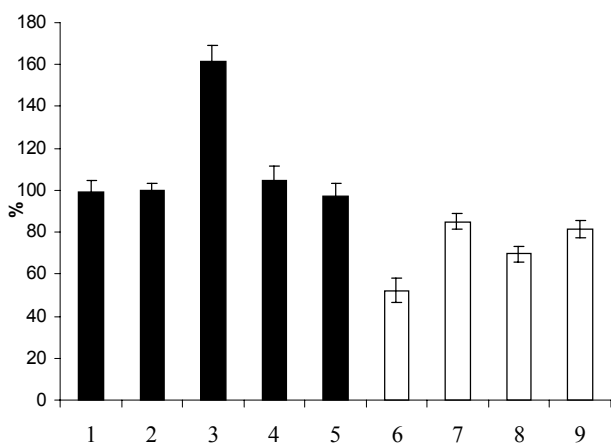
Для трансплантации использовали КОКННП, выращенную по стандартной методике [2] и криоконсервированную по двухэтапной программе под защитой 5%-го димексида [6]. Осуществляли КТ адrenaл-эктомированным (АЭ) и ложнооперированным (ЛЮ) крысам через 30 сут после адrenaлэктоми. Животным трансплантировали КОКННП, инкубированную 1ч при 37°C в среде 199: 1) без воздействий; 2) с 10 мкл экстракта гипофиза (ЭГ); 3) с 50 мкл ЭГ. Через 30 сут после КТ животных забивали и производили биохимический и гистологический анализы. Исследование 11-ОКС проводили флуориметрическим методом [1, 7].

Содержание 11-ОКС в плазме крови АЭ крыс к 30-м суткам после КТ составляет $52.3 \pm 4.6\%$ от их уровня у ЛЮ животных (рисунок). Во всех группах АЭ крыс с КТ КОКННП наблюдается стойкое повышение уровня 11-ОКС в плазме по сравнению с АЭ крысами без КТ ($P < 0.05$), однако степень этого повышения находится в зависимости от функционального состояния КОКННП перед КТ. Так, самое высокое содержание глюкокортикоидов у АЭ крыс с КТ наблюдается у

Substitutive corticosteroid therapy is one of the types of adrenal gland insufficiency treatment, and transplantation of adrenal gland organ culture is considered as the most physiological method of this syndrome treatment [4, 5]. Progress in current cryobiology allows the long-term storage of endocrine material without significant loss of its functional characteristics, that allows its therapeutic effect at transplantation. Xenotransplantation (XT) of cryopreserved adrenal gland organ culture of new-born piglets (CAGOCNP) between the distant species (in our case: rats and new-born piglets) can be the model for the studying of both mechanisms of steroid genesis in xenograft cells, and vital terms of cryopreserved transplant in a recipient's organism.

The aim of this investigation is to study the influence of various functional state of CAGOCNP before the transplantation on graft compensatory role in a recipient's organism, that primarily is reflected on the content of 11-oxycorticosteroid (OCS) in blood plasma of experimental animals. For transplantation we used the CAGOCNP, cultured according the standard method [2] and cryopreserved by the two-step program under 5% Me₂SO protection [6]. The XT was performed to adrenal ectomised (AE) and pseudooperated (PO) animals in 30 days after an adrenal ectomy. We have transplanted to animals the CAGOCNP, incubated during 1 hr at 37°C in "199" medium 1) without additional treatment, 2) with 10 mcl of hypophysis extract (HE) and 3) with 50 mcl of HE. To the 30th day after XT the animals were slaughtered and biochemical and histological analyses were made. Investigation of 11-OCS was performed by the fluorimetric method [1, 7].

The 11-OCS content in blood plasma of AE rats to the 30th day after XT makes $52.3 \pm 4.6\%$ of that in PO animals (Figure). In all groups of AE rats with XT of CAGOCNP we observed a stable increase of 11-OCS in plasma comparing to AE rats without XT ($p < 0.05$), but the extent of this increase depends on the functional state of CAGOCNP before the XT. So we have observed the highest content of glucosteroids in AE rats with XT of the culture without the stimulus effect and this made $85.2 \pm 3.8\%$ of that in PO rats, the lowest value was observed in rats with XT of CAGOCNP, incubated with 10 µl of HE and made $69.5 \pm 3.5\%$ of that in PO rats.



животных с трансплантацией культуры без действия стимулятора и составляет $85.2 \pm 3.8\%$ от ЛО крыс, тогда как самый низкий - при КТ КОКННП, инкубированной с 10 мкл ЭГ, составляет $69.5 \pm 3.5\%$ от ЛО крыс. Промежуточное значение уровня 11-ОКС у АЭ крыс с КТ КОКННП, инкубированной с 50 мкл ЭГ.

Высокое содержание 11-ОКС в плазме крови АЭ крыс с КТ КОКННП без воздействий, вероятно, можно объяснить тем, что не активированная стимулятором культура, попав в организм реципиента, активно функционирует, тогда как стимулированная 10 мкл ЭГ культура в организме реципиента повторно попадает под действие стимулятора и, не имея времени и резервов для восстановления, вероятно, быстрее вырабатывается. КОКННП, обработанная 50 мкл ЭГ, не давала повышения секретируемых гормонов при инкубации со стимулятором перед КТ из-за нефизиологических концентраций АКТГ, в которых он, очевидно, выступает в роли не стимулятора, а ингибитора [3]. При КТ эта культура восстанавливала свои функциональные характеристики по выработке и секреции глюкокортикоидов.

У ЛО крыс с КТ отмечается повышение уровня 11-ОКС в плазме, что также находится в зависимости от функционального состояния культуры перед трансплантацией. Однако прямой зависимости в содержании глюкокортикоидов у АЭ и ЛО крыс с КТ КОКННП с различной функциональной активностью не обнаружено, что можно объяснить различным гормональным статусом животных и содержанием АКТГ в организмах крыс, а также различными способами регуляции функционирования трансплантатов.

Следует отметить, что во всех группах экспериментальных животных с КТ через 30 сут после операции было обнаружено различное количество трансплантатов культур, находящихся в разном состоянии (диффузно расположенные, кусочками, васкуляризированные кусочки).

Измерение 11-ОКС в гомогенатах надпочечников ЛО крыс с КТ показало пониженное содержание глюкокортикоидов, что во всех ее вариантах достоверно ниже ($P < 0.05$), чем в гомогенатах надпочечников ЛО и неоперированных (НО) крыс. Содержание 11-ОКС составляет от 0.254 ± 0.016 до 0.475 ± 0.014 мкг/мг белка у ЛО с КТ по сравнению с 0.801 ± 0.019 мкг/мг белка в гомогенатах надпочечников ЛО крыс. Это, вероятно, может быть следствием развития

◀ Содержание 11-ОКС в плазме крови крыс через 30 сут после КТ КОКННП с различной функциональной активностью: 1 – ЛО крысы; 2 – НО крысы; 3 – ЛО крысы с КТ КОКННП без воздействий; 4 – ЛО крысы с КТ КОКННП с 10 мкл ЭГ; 5 – ЛО крысы с КТ с 50 мкл ЭГ; 6 – АЭ крысы; 7 – АЭ крысы с КТ КОКННП без воздействий; 8 – АЭ крысы с КТ КОКННП с 10 мкл ЭГ; 9 – АЭ крысы с КТ с 50 мкл ЭГ.

◀ 11 - OCS content in blood plasma of rats in 30 days after xenotransplantation of COCNPAG with different functional activity: 1 – pseudo-operated rats (P/O); 2 – non-operated rats; 3 - P/O with xenotransplantation (XT) of COCNPAG without effects; 4 - P/O with XT of COCNPAG with 10 mcl of hypophysis extract; 5 - P/O with XT of COCNPAG with 50 mcl of hypophysis extract; 6 – adrenalectomised rats (A/E); 7 - A/E with XT of COCNPAG without effects; 8 – A/E with XT of COCNPAG with 10 mcl of hypophysis extract; 9 - with XT of COCNPAG with 50 mcl of hypophysis extract.

Intermediate value of 11-OCS is observed in AE rats with XT of CAGOCNP, incubated with 50 mcl of HE.

High value of 11-OCS in blood plasma of AE rats with XT of CAGOCNP without an additional effect can be explained probably by the fact, that culture, non-activated with stimulator, being placed into patient's organism, actively functions, and the culture, stimulated with 10 mcl of HE, in patient's organism is repeatedly underwent the stimulus effect and probably is faster exhausted because of the lack of time and resources for recovery. CAGOCNP, being treated with 50 mcl of HE, did not give the increase of secreted hormones at incubation with the stimulus prior to the XT, because of the non-physiological concentrations of adrenocorticotrophic hormone, where it likely acts as not stimulus, but inhibitor [3]. Being xenotransplanted this culture recovered its characteristics of production and secretion of glucosteroids.

In PO rats with XT we observed an increase of 11-OCS in plasma, that depends also on functional state of the culture prior to the transplantation. However, there are no direct dependence in glucocorticoids content of AE and PO rats with XT of CAGOCNP with various functional activity, that can be explained by various hormonal status of animals and adrenocorticotrophic hormone content in rats organism, and by various ways of transplant functioning regulation.

It should be noted, that in all experimental groups with XT in 30 days after operation we have found various amount of culture transplants, being in various state (diffuse formations, slices, vasculated slices).

Measurement of 11-OCS in adrenal gland homogenates of PO rats with XT showed the decreased content of glucocorticoids, that in all cases of XT was statistically and significantly low ($p < 0.05$) than that one in adrenal glands homogenates of PO and non-operated (NO) rats. The content of 11-OCS makes 0.254 ± 0.016 to 0.475 ± 0.014 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein in PO rats with XT, comparing to 0.801 ± 0.019 $\mu\text{g}/\text{mg}$ of protein in adrenal gland homogenates of PO rats. This could be probably the result of development of adrenal gland insufficiency caused by transplant functioning.

Thus, the CAGOCNP state prior to the transplantation is very important for functioning of xenotransplant, that influences the 11-OCS value in blood plasma of experimental animals and glucocorticoids content in adrenal glands of PO rats with XT.

надпочечниковой недостаточности в результате функционирования трансплантата.

Таким образом, состояние КОКННП перед трансплантацией играет важную роль в функционировании ксенотрансплантата, что отражается на уровне 11-ОКС в плазме крови экспериментальных животных и на содержании глюкокортикоидов в надпочечниках ЛО крыс с КТ.

Литература

1. Бондаренко Т.П., Геращенко А.В., Божок Г.А., Алабедаль-карим Н.М. Оптимизация условий экстрагирования и развития флуоресценции при определении глюкокортикоидов в биологических жидкостях // Лаб. диагностика. – 2001. – №3. – С. 36-39.
2. Заготівля, кріоконсервування та клінічне застосування органної культури наднирників новонароджених поросят в лікуванні недостатності наднирників: Метод. рекомендації / Укл. Грищенко В.І., Бондаренко Т.П., Божок Г.А. та ін. – Харків, 2000. – 14 с.
3. Комиссаренко В.П., Онищенко Д.С., Турчин И.С. Цитологические и функциональные измерения в клеточной культуре надпочечников собак под влиянием АКТГ // Пробл. эндокринологии. – 1974. – №3. – С. 77-81.
4. Січінава Р.М. Гормональний статус в крові хворих з постадреналектомічним гіпокортицизмом після трансплантації органної культури наднирникових залоз новонароджених поросят // Трансплантологія. – 2000. – Т.1, №1. – С. 153-156.
5. Турчин И.С. Проблема трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія. – 1996. – Т.1, №2. – С. 6-13.
6. Пат. 34848 А України МПК С12 №5/02. Спосіб кріоконсервування клітин адренокортикальної тканини / Т.П.Бондаренко, Є.І.Легач. Заявл. 13.07.99. Публ. 15.03.01 // Бюл. №2.ІІ ч. – С.173.
7. Kowal J., Feidler R. Adrenal cells in tissue culture. I Assay of steroid products // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – V.128. – P.406-421.

Поступило 2.04.2002

УДК 615.361.014.41.631:57.086.13

UDC 615.361.014.41.631:57.086.13

Функциональные характеристики органной культуры семенников при кріоконсервировании

АБУ ЖАЯБ САЛЕХ, Т.П. БОНДАРЕНКО

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Functional Characteristics of Testes Organ Culture Under Cryopreservation

ABUJAYYAB SALEH, BONDARENKO T.P.

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

В настоящее время бесплодность диагностируется у 15-20 % семейных пар, причем по вине мужчин почти в 50 % случаев [2]. Для коррекции эндокринного статуса широко применяется ксенотрансплантация органных культур соответствующих эндокринных тканей, в том числе и семенников новорожденных поросят [3]. Использование нативных органных культур ограничено, а более широкое внедрение в практику данного способа коррекции эндокринного статуса организма возможно лишь на основе создания низкотемпературных запасов органных культур. Результаты, полученные при исследовании секреторной способности органных культур надпочечников, хранившихся 1 год при -196 °С, а также наши исследования органных культур

References

1. Bondarenko T. P., Geraschenko A. V., Bozhok G. A., Alabedalkarim N. M. Optimisation of conditions of extracting and fluorescence development when determining the glucocorticoids biological fluids // Lab. Diagnostika. – 2001. – N3. – P. 36–39.
2. Collection, cryopreservation and clinical application of newborn piglets adrenal glands organ culture in treatment of adrenal gland insufficiency: Methodical recommendations. Ed. by Gryschenko V. I., Bondarenko T. P., Bozhok G. A., et al. – Kharkov, 2000. – 14 p.
3. Komissarenko V. P., Onischenko D. S., Turchin I. S. Cytological and functional measurements in cell culture of dog adrenal glands with influence of adrenocorticotrophic hormone // Probl. endokrinologii. – 1974. – N 3. – P. 77-81.
4. Sichinava R. M. Hormonal status in blood of patients with postadrenalectomical hypocorticism after transplantation of newborn piglets adrenal glands organ culture // Transplantologiya. – 2000. – V.1, N1. – P. 153-156.
5. Turchin I. S. Problem of transplantation of endocrine glands cells and tissue cultures to patients with various endocrinopathy forms // Endokrinologiya. – 1996. – V. 1, N 2. – P. 6-13.
6. Patent of Ukraine 34848 A, IPC^b C 12 N5/02. Method of cryopreservation of adrenocortical tissue cells / Bondarenko T. P., Legach E. I. Filed in 13. 07. 99. Published 15. 03. 01. Bulletin N 2. 2nd part. – P. 173.
7. Kowal J., Feidler R. Adrenal glands in tissue culture. 1. Assay of steroid products // Arch. Biochem. Biophys. – 1968. – V.128. – P. 406-421.

Accepted in 1.04.2002

Nowadays the infertility is diagnosed in 15-20% of couples, moreover in 50% of cases was due to the men [2]. Xenotransplantation of organ cultures of corresponding endocrine tissues, including the newborn piglets' testes, is widely applied for endocrine status correction [3]. Usage of native organ cultures is limited, and a wider introduction of this method into the practice for an organism's endocrine status correction is possible only at the base of establishment of low temperature stocks for organ cultures. The results obtained when studying the secreting capabilities of adrenal gland's organ cultures, stored for 1 year under -196°C, as well as our investigations of testes organ cultures, stored during 1 month, testify to the equal secreting capability of cryopreserved material during these