

Гормонпродуцирующая способность органной культуры семенников взрослых крыс при совместных культивировании и аллотрансплантации

А.В. ПАХОМОВ, Г.А. БОЖОК, Е.И. ЛЕГАЧ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

Hormone-Producing Ability of Testes Organ Culture in Adult Rats Under Co-culturing and Allotransplantation

A.V. PAKHOMOV, G.A. BOZHOK, E.I. LEGACH

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

Исследовали гормонпродуцирующую способность органной культуры семенников взрослых крыс (ОКСВК) при совместных культивировании и аллотрансплантации с органной культурой надпочечников взрослых крыс (ОКНВК) и эксплантатом гипофиза (ЭГ). Было показано снижение секреторных способностей ОКСВК, культивированной совместно с ОКНВК и ЭГ. Последующая совместная трансплантация данных культур также не приводила к увеличению уровня тестостерона в крови орхиэктомированных крыс. Однако совместная аллотрансплантация ОКСВК и ОКНВК, культивированных отдельно, восстанавливала субнормальный гормональный уровень у орхиэктомированных животных.

Ключевые слова: органная культура, семенники, надпочечники, совместная трансплантация.

Досліджували гормонпродуцуючу властивість органної культури сім'яників дорослих щурів (ОКСДЩ) в умовах сумісних культивування та алотрансплантації з органною культурою надниркових залоз дорослих щурів (ОКНЗДЩ) і експлантатом гіпофіза (ЕГ). Було показано зниження секреторних властивостей ОКСДЩ, культивованих сумісно з ОКНЗДЩ і ЕГ. Наступна сумісна трансплантація цих культур також не призводила до зростання рівня тестостерону в крові орхіектомованих щурів. Однак сумісна алотрансплантація ОКСДЩ та ОКНЗДЩ, культивованих роздільно, відновлювала субнормальний гормональний рівень у орхіектомованих тварин.

Ключові слова: органна культура, сім'яники, надниркові залози, сумісна трансплантація

The hormone-producing ability of testes organ culture of adult rats (TOCAR) under co-culturing and allotransplantation with organ culture of adrenal glands of adult rats (OCAGAR) and pituitary explant (PE), was investigated. A decrease in secretory abilities of TOCAR, co-cultured with OCAGAR and PE, was demonstrated. The following co-transplantation of these cultures did not either result in the augmentation of testosterone level in blood of orchietomized rats. However, the combined allotransplantation of TOCAR and OCAGAR, cultured separately, resulted in a subnormal hormone level recovery in orchietomized animals.

Key-words: organ culture, testes, adrenal glands, co-transplantation.

Одним из подходов к решению проблем, связанных с недостатком стероидных гормонов, в том числе мужских половых стероидов, является трансплантация аллогенного и ксеногенного клеточного и тканевого материала желез. Данный способ коррекции гормонального фона имеет как преимущества, так и недостатки. К примеру, по сравнению с заместительной терапией, безусловные преимущества трансплантации в том, что наличие аллогенных или ксеногенных клеток в организме в условиях тропной стимуляции позволяет более адекватно реагировать на такие различные сигналы, поступающие из внешней и внутренней среды, как изменение температуры, смена сезонов, погоды, многочисленные стрессорные факторы (травмы, голод, холод, различные хирургические, терапевтические воздействия) и т.д. [3].

One of the approaches when solving the problems dealing with the lack in steroid hormones, including male sexual steroids, is the transplantation of allogenic and xenogenic cell and tissue material of glands. This way for the hormonal background correction has both advantages and defects. For example, if comparing with a substitutive therapy, the absolute advantages of transplantation consist in the fact, that the presence of allogenic or xenogenic cells in an organism under tropic stimulation allows to respond more adequately to such various signals, entering from inner and outer environment as a change in temperature, weather, season turn, many stress factors (traumas, starvation, cold, different surgical, therapeutic effects) etc. [3].

However the clinical experience of transplantation demonstrated a different duration of transplant's functioning in the recipient's organism. The reduction of terms of transplant's functioning is the result of

Адрес для корреспонденции: Божок Г.А., 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: Bozhok G.A., 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 57 772 0084, e-mail: cryo@online.kharkov.ua

Вместе с тем клинический опыт трансплантаций показал различную длительность функционирования трансплантата в организме реципиента. Сокращение сроков функционирования трансплантата является следствием развития процессов иммунологического отторжения и (или) значительного снижения секреторной и пролиферативной активности трансплантационного материала. Совместное культивирование и трансплантация двух и более типов клеток или фрагментов ткани – один из способов решения проблемы пролонгирования жизнедеятельности трансплантата.

В пользу этого свидетельствуют данные о том, что клетки Сертоли семенников могут проявлять защитный эффект при совместной трансплантации благодаря присутствию на них Fas-лиганда, который вызывает апоптоз иммунокомпетентных клеток реципиента [8]. При этом совместная трансплантация островков поджелудочной железы с клетками Сертоли создает локальную иммунную привилегию и позволяет длительно выживать трансплантату островковых клеток без системной иммуносупрессии. Гипофиз, трансплантированный совместно с островками Лангерганса [5], способствовал значительному уменьшению уровня гликемии и возрастанию уровня инсулина по сравнению с трансплантатом без гипофиза. В работе [9] описан удачный опыт клинического применения совместной трансплантации периферических нервов и мозгового слоя надпочечников пациентам с болезнью Паркинсона.

Цель работы – исследовать свойства ОКСВК при совместных культивировании и аллотрансплантации с ОКНВК, секретирующей иммуносупрессорные стероидные гормоны, а также с ЭГ, продуцирующим тропные гормоны. Следует отметить, что секреторные продукты гипофиза и надпочечников, используемых для совместной трансплантации, с одной стороны, активно, а с другой – по-разному влияют на метаболизм семенника. Выбор именно этих объектов для совместной трансплантации был сделан исходя из следующих соображений: глюкокортикоиды, обладая в целом катаболическим действием на многие виды клеток, угнетают синтез и секрецию тестостерона, но их иммуносупрессорное действие может препятствовать развитию реакций иммунологического отторжения, а гормоны гипофиза, в частности лютеинизирующий (ЛГ) и фолликулостимулирующий (ФСГ), способствуют активации стероидогенеза.

Материалы и методы

Органнне культуры семенников и надпочечных желез получали по методу [1,2] в среде RPMI, содержащей 10%-ю теплоинактивированную

immunological rejection process development and (or) considerable decrease in secretory and proliferative activity of transplantation material. Co-culturing and transplantation of two and more cell types or tissue fragments are one of the ways to solve the task of a transplant's vital activity prolongation.

The data about the fact, that the Sertoli cells of testes can manifest a protective effect under co-transplantation due to the Fas-ligand presence in them, causing the apoptosis in a recipient's immune competent cells, testify to this favor [8]. At the same time the co-transplantation of pancreas islets with Sertoli cells makes a local immune privilege and allows a long-term survival for the islet cells' transplant without systemic immune suppression. The pituitary, transplanted together with the Langerhans islets [5] contributed to a considerable decrease in the glycemia level and an increase in that of insulin in comparison with a pituitary-free transplant. In the work [9] there was described a successful experience of clinical application of co-transplantation of peripheric nerves and medullar layer of adrenal glands to the patients with Parkinson's disease.

The aim of this work was to investigate the TOCAR properties during co-culturing and allotransplantation with OCAGAR, secreting the immune suppressive steroid hormones, as well as with PE, producing tropic hormones. It should be noted that the secretory products of pituitary and adrenal glands, used for co-transplantation, actively affect testis metabolism, on the one hand, but in a different way on another. The choice namely for these objects to be co-transplanted was done basing on the following reasons: the glucocorticoids, having a catabolic effect in the whole on many cell types, suppress the testosterone synthesis and secretion, but their immune suppressive effect can prevent against the immune rejection development but the pituitary hormones, luteinizing (LH) and follicle-stimulated (FSH) ones in particular, contribute to the steroidogenesis activation.

Materials and methods

Testicular and adrenal organ cultures were procured according to the method [1, 2] in RPMI medium, containing a 10% heat-inactivated embryonic calf serum and antibiotics. Testosterone level was estimated with radioimmunologic method in the incubation medium to the 5th day of culturing and in rat blood serum to the 20th day after transplantation. The conversion of testosterone content in cultivation medium was done per gram of TOCAR protein, which was measured using the Bradford's method. The viability of TOCAR cells was controlled before transplantation using the method of supravital staining with trypan blue. It made 70-80 % in average. The orchietomy was performed to the 3-4 months' rats

эмбриональную телячью сыворотку и антибиотики. Уровень тестостерона в среде инкубации на 5-е сутки культивирования и в сыворотке крови крыс на 20-е сутки после трансплантации измеряли радиоиммунологическим методом. Пересчет содержания тестостерона в среде культивирования проводился на грамм белка ОКСВК, который измеряли по методу Бредфорда. Жизнеспособность клеток ОКСВК контролировали перед трансплантацией методом суправитального окрашивания с трипановым синим. Она в среднем составляла 70-80%. Орхиэктомию 3-4-месячным крысам проводили под кетамин-ксилазиновой анестезией. Непосредственно после удаления семенников трансплантировали эндокринный материал под почечную капсулу в следующих комбинациях: 1) ОКСВК; 2) ОКСВК и ОКНВК, культивированные совместно; 3) ОКСВК и ОКНВК, культивированные раздельно; 4) ОКСВК и ЭГ, культивированные совместно. При совместной аллотрансплантации ОКСВК и ОКНВК животных подвергали также левосторонней адrenaлэктоми. На 20-е сутки после трансплантации животных умерщвляли под эфирным наркозом, почки с трансплантатом извлекали и фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина. Для гистологического анализа 5-7 мкм парафиновые срезы окрашивали гематоксилином и эозином по стандартной методике.

Результаты и обсуждение

При измерении тестостерона в питательной среде была показана секреторная способность ОКСВК на 5-е сутки культивирования (рис.1). Уровень содержания тестостерона достигал $0,085 \pm 0,013$ нмоль/г белка и не был связан с выходом гормона в результате повреждения клеток культуры в процессе культивирования, что было подтверждено измерением их жизнеспособности.

Аллотрансплантация ОКСВК к 20-му дню приводила к увеличению уровня тестостерона по сравнению с орхиэктомированными животными приблизительно в два раза (рис.2). Содержание тестостерона в сыворотке крови орхиэктомированных животных составило $0,18 \pm 0,062$ нмоль/л, тогда как у крыс с трансплантированной ОКСВК – $0,385 \pm 0,163$ нмоль/л.

Гистологические исследования показали признаки отторжения. Были обнаружены глубокая деструкция семенных канальцев, значительные зоны некроза и лимфоцитарной инфильтрации.

Причиной того, что концентрация тестостерона у животных после трансплантации органной культуры была все же ниже по сравнению с контрольными животными, могло быть изменение

under ketamine-xylasinum anesthesia. Right after testes removal an endocrine material was transplanted under kidney capsule in following combinations: 1) TOCAR; 2) co-cultured TOCAR and OCAGAR; 3) TOCAR and OCAGAR cultured separately; 4) co-cultured TOCAR and PE. Under combined allotransplantation of TOCAR and OCAGAR the animals were also subjected to a left-side adrenalectomy. To the 20th day after transplantation the animals were killed with ether narcosis, the kidneys with a transplant were removed and fixed in 10% neutral formalin solution. The 5-7 μ m paraffin sections were stained with hematoxylin and eosin for histological analysis according to the standard technique.

Results and discussion

When measuring testosterone in culture medium the TOCAR secretory ability was shown to the 5th day of culturing (Fig. 1). The level of testosterone content reached 0.085 ± 0.13 nM/g of protein and was not related to the hormone release as a result of culture cell damage during culturing, that was confirmed by the change in their viability.

To the 20th day the TOCAR allotransplantation resulted in the augmentation of testosterone level approximately twice if comparing with the orchietomized animals (Fig. 2). The testosterone content in blood serum of orchietomized animals made 0.18 ± 0.062 nM/l, whereas it was 0.385 ± 0.163 nM/l in the TOCAR-transplanted rats.

The rejection signs were seen during histological investigations. Deep destruction of seminiferous tubules, considerable zones of necrosis and lymphocytic infiltration were found out.

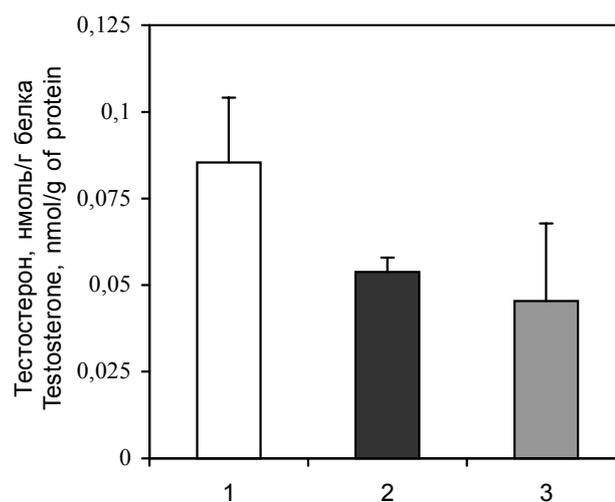


Рис.1. Содержание тестостерона на 5-е сутки в среде культивирования: 1 – ОКСВК; 2 – ОКСВК+ОКНВК; 3 – ОКСВК+ЭГ.

Fig. 1. Testosterone content to the 5th day in culturing medium: 1 – TOCAR; 2 – TOCAR+TOCAGAR; 3 – TOCAR+PE.

количества свободного и связанного тестостерона в крови на фоне снижения гормонпродуцирующей способности ОКСВК в результате развития процессов иммунологического отторжения, а также с изменением характеристик клеток семенников на еще более ранних этапах, т.е. при культивировании, что сказалось при помещении их после трансплантации в условия усиленной тропной стимуляции [6,10] и (или) недостаточным количеством трансплантата по сравнению с семенниками *in vivo*.

Исследование свойств совместно культивированных ОКСВК и ОКНВК показало снижение содержания тестостерона в среде инкубации, что свидетельствует о более ранней остановке стероидогенеза в семенниках к 5-му дню культивирования. Уровень содержания тестостерона в среде инкубации составлял $0,054 \pm 0,003$ нмоль/г белка против $0,085 \pm 0,013$ нмоль/г белка в среде с одиночной ОКСВК (см. рис. 1). Уменьшение скорости синтеза и секреции тестостерона закономерно в связи с появлением в среде инкубации глюкокортикоидов, снижающих синтетические процессы во многих тканях организма. Эффект ингибирования стероидогенеза *in vitro* в клетках Лейдига под действием кортизола был показан в [7, 11]. Нельзя было не принимать во внимание также и тот факт, что общее увеличение содержания стероидов в среде инкубации могло влиять на секрецию тестостерона клетками Лейдига и вызывать торможение синтетических процессов по пути отрицательной обратной связи. Однако необратимость угнетения стероидогенной функции совместно культивированных ОКНВК и ОКСВК была показана впоследствии и при совместной трансплантации. Были отмечены низкие показатели концентрации тестостерона в крови ($0,149 \pm 0,112$ нмоль/л) по сравнению с контролем ($0,980 \pm 0,530$ нмоль/л) (рис.2).

Гистологические исследования трансплантатов ОКСВК, культивированной с ОКНВК, показали значительное развитие экссудативно-продуктивных процессов. На гистологических препаратах были видны остатки некротических семенных канальцев, зоны лимфоцитарной инфильтрации, а также формирующаяся соединительная ткань.

Интересный эффект был получен при совместной аллотрансплантации культивированных отдельно ОКСВК и ОКНВК. Показано увеличение концентрации тестостерона в сыворотке крови этих животных на 20-й день по сравнению с показателями тестостерона в крови у орхиэктомированных животных. Концентрация тестостерона составляла $0,562 \pm 0,168$ нмоль/л, что досто-

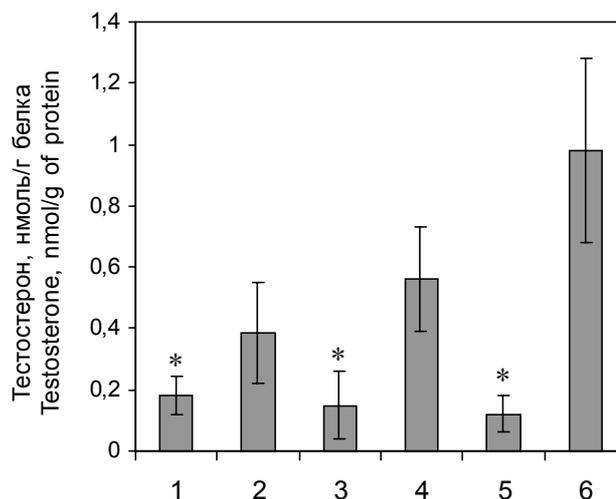


Рис. 2. Содержание тестостерона в сыворотке крови орхиэктомированных крыс (1); крыс с трансплантацией ОКСВК (2); совместно культивированных ОКСВК+ОКНВК (3); отдельно культивированных ОКСВК+ОКНВК (4); ОКСВК+ЭГ (5); контрольных крыс (6). * – $p < 0,05$ по сравнению с контролем.

Fig. 2. Testosterone content in blood serum of orchietomized rats (1); rats with TOCAR transplantation (2); co-cultured TOCAR+OCAGAR (3); cultured separately TOCAR+OCAGAR (4); TOCAR+PE (5); the control rats (6). * – $p < 0.05$ in comparison with the control.

The cause of the fact that the testosterone concentration in animals after organ culture transplantation was lower in comparison with the control animals can be related to the changes in the amount of free and bound testosterone in blood at the background of a decrease in TOCAR hormone-producing capability as a result of the immunological rejection process development as well as to a change in the testicular cell characteristics at quite earlier stages, that affected when placing them after transplantation under conditions of strengthened tropic stimulation [6, 10] and (or) an insufficient quantity of a transplant in comparison with testes *in vivo*.

The investigation of properties of co-cultured TOCAR and OCAGAR demonstrated a decrease in testosterone content in the incubation medium, that testified to an earlier stopping of steroidogenesis in testes to the 5th day of culturing. The level of testosterone content in the incubation medium made 0.054 ± 0.003 nmol/g of protein versus 0.085 ± 0.013 nmol/g of protein in the medium with single TOCAR (Fig.1). A decrease in synthesis rate and testosterone secretion is regular due to the appearance in the incubation medium of glucocorticoids, reducing the synthetic processes in many tissues of organism. The effect of steroidogenesis inhibition *in vitro* in Leydig's cells under hydrocortisone effect was shown in the papers [7, 11]. The

верно не отличалось от показателя уровня гормона у контрольных животных ($0,98 \pm 0,53$ нмоль/л) (рис.2).

При гистологическом анализе совместных трансплантатов раздельно культивировавшихся культур также отмечены значительные некротические разрушения семенных канальцев, зоны лимфоцитарной инфильтрации, включающей эозинофильные лимфоциты.

Вероятно, высокая гормонпродуцирующая способность ОКСВК и иммунная привилегия графта, обеспеченная кортикоидами, давала некоторое преимущество совместному трансплантату по сравнению с одиночной ОКСВК на первых этапах после трансплантации, т.е. до развития реакций иммунологического отторжения. Это способствовало более позднему началу падения уровня общего тестостерона в крови в результате развития отторжения и снижения гормонопродукции ОКСВК, что явилось причиной наличия достаточно высокого уровня гормона в крови к 20-му дню после трансплантации.

Итоги исследования состояния совместной культуры семенников с эксплантатами гипофиза также показали сниженный по сравнению с одиночной ОКСВК уровень содержания тестостерона в среде инкубации: $0,045 \pm 0,015$ нмоль/г белка в среде с ОКСВК и ЭГ против $0,085 \pm 0,013$ нмоль/г белка в ОКСВК (см. рис. 1). Парадоксальный эффект угнетения стероидогенеза мог быть связан с тем, что длительная и непрерывная стимуляция ЛГ, содержащимся в эксплантате гипофиза, приводила к уменьшению активности 17α -гидроксилазы и одновременно активации 5α -редуктазы [4]. Уменьшение выработки тестостерона наблюдалось и при совместной трансплантации данных культур. Концентрация тестостерона в сыворотке была на уровне концентрации у орхидектомизированных крыс и составляла $0,121 \pm 0,061$ нмоль/л (рис.2).

На гистологических препаратах было видно большое количество некротизированных семенных канальцев с наличием инфильтрата лимфоцитов.

Возможно, в данном случае действие гипофизарных гормонов *in vitro* было направлено не на активацию стероидогенеза [10], а на увеличение пролиферативной активности интерстициальных клеток культуры семенников [6]. На момент трансплантации ОКСВК обладала наиболее низким уровнем секреторной активности, а развитие процессов отторжения приводило к более быстрому снижению уровня свободного и связанного тестостерона в крови орхидектомизированных животных после трансплантации.

fact, that the total augmentation of steroid content in the incubation medium could affect the testosterone secretion by Leydig's cells and cause the inhibition of synthetic processes via negative reversible connection, could not be rejected. However the irreversibility of suppression in steroidogenic function of co-cultured OCAGAR and TOCAR was shown later and during co-transplantation. The low indices of testosterone concentration in blood (0.149 ± 0.112 nmol/l) in comparison with the control (0.980 ± 0.530 nmol/l) were noted (Fig.2).

Histological investigations of TOCAR transplants, cultured with OCAGAR demonstrated a considerable development in the exudative and productive processes. The residuals of necrotic seminiferous tubules, the areas of lymphocytic infiltration, as well as a forming connective tissue were visible in histological preparations.

An interesting effect was obtained during co-transplantation of TOCAR and OCAGAR, cultured separately. There was demonstrated an increase in testosterone concentration in blood serum of these animals to the 20th day in comparison with testosterone indices in blood of orchietomized animals. The testosterone concentration made 0.562 ± 0.168 nmol/l, that did not statistically and significantly differ from that of hormone level in control animals (0.98 ± 0.53 nmol/l) (Fig.2.).

Histological analysis in co-transplants of cultured separately cultures demonstrated also a considerable necrotic destruction of seminiferous tubules, areas of lymphocytic infiltration, including eosinophil lymphocytes.

A high hormone-producing ability of TOCAR and a graft's immune privilege, provided by corticoids, probably gave a certain advantage of co-transplantation in comparison with a single TOCAR at the first stages following transplantation, i.e. before the immunological rejection development. This contributed to a later beginning of a decrease in total testosterone level in blood as a result of the rejection development and a reduction in TOCAR hormone production, that was a reason for the presence of a quite high hormone level in blood to the 20th day after transplantation.

The investigation results of co-culture state of testis with pituitary explants demonstrated also a reduced level of testosterone content in comparison with a single TOCAR in the incubation medium: 0.045 ± 0.015 nmol/g of protein in the medium with TOCAR and PE against 0.085 ± 0.013 nmol/g of protein in TOCAR (Fig.1). A paradoxical effect of steroidogenesis suppression could be related to the fact that a long-term and continued LH stimulation, being in pituitary explant, resulted in a decrease in 17α -hydroxylase activity and simulta-

Выводы

Таким образом, исходя из показателей содержания тестостерона в среде и сыворотке крови, а также гистологического анализа трансплантатов, можно сделать вывод об угнетении продукции тестостерона ОКСВК при её совместном культивировании с ОКНВК и гипофизом. Данное ингибирование было показано также и при совместной трансплантации. Однако совместная аллотрансплантация ОКСВК с ОКНВК, культивировавшихся раздельно, приводила к значительному увеличению концентрации тестостерона в крови экспериментальных животных. Гистологические исследования трансплантатов, полученных на 20-й день, свидетельствуют о наличии различных стадий процесса отторжения во всех исследованных случаях.

Литература

1. *Потіха О.П., Челнакова І.С., Турчин І.С.* Ауто- та ксенотрансплантація органних культур сім'яників кастрованим щурам та щурам із експериментальним гіпогонадизмом // Физиолог. журн.– 1993.– Т.39, №5-6.– С. 70-75.
2. *Тронько Н.Д., Богданова Т.И., Турчин И.С.* Ультраструктурная характеристика органных культур надпочечников новорожденных поросят // Эндокринология.– 1988.– Т.34, №5.– С.65-69.
3. *Турчин І.С.* Проблеми трансплантації культур клітин і тканин залоз внутрішньої секреції хворим з різними формами ендокринопатії // Ендокринологія.– 1996.– Т.1, №2.– С. 6-13.
4. *Chatani F., Nonoyama T., Sudo K. et al.* Stimulatory effect of luteinizing hormone on the development and maintenance of 5 alpha-reduced steroid-producing testicular cell tumors in Fischer 344 rats // Anticancer Res.– 1990.– Vol. 10.– P. 337-342.
5. *Davalli A.M., Maffi P., Socci C.* Insights from a successful case of intrahepatic islet transplantation into a type 1 diabetic patient // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 2000.– Vol. 85.– P. 3847-3852.
6. *Ferguson S.S., Morita Y.* RNA synthesis and adrenocortical responsiveness // Biochim. Biophys. Acta.– 1964.– Vol.87.– P. 348-350.
7. *Hales D.B., Payne A.H.* Glucocorticoid-mediated repression of P450scc mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells // Endocrinology.– 1989.– Vol. 124.– P. 2099-2104.
8. *Lan P., Yan L., Xiao L.* Induction of islet transplantation tolerance with anti-CD4, anti-CD8 immunotoxins and donor soluble antigen // Chin. Med. J. (Engl).– 1999.– Vol. 112.– P. 1109-1111.
9. *Lopez-Lozano J.J., Brera B., Abascal J., Bravo G.* Preparation of adrenal medullary tissue for transplantation in Parkinson's disease: a new procedure. Technical note // J. Neurosurg.– 1989.– Vol. 71.– P. 452-454.
10. *O'shaughnessy P.J., Payne A.H.* Differential effects of single and repeated administration of gonadotropins on testosterone production and steroidogenic enzyme in Leydig cells populations // J. Biol. Chem.– 1982.– Vol. 257.– P. 11503-11509.
11. *Welsh J.T.H., Bambino T.H., Hsueh A.J.W.* Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen

neously in 5 α -reductase activation [4]. A decrease in testosterone production was observed when co-transplanting these cultures as well. The testosterone concentration in serum was like in orchietomized rats and made 0.121 \pm 0.061 mol/l (Fig. 2).

Histological preparations demonstrated a big number of necrotized seminiferous tubules with lymphocyte infiltrate presence.

In this case the effect of pituitary hormones *in vitro* was likely targeted not to activate steroidogenesis [10], but to increase a proliferative activity of interstitial cells in testicular culture [6]. To the moment of transplantation the TOCAR had the lowest level in secretory activity, and the development of rejection processes resulted in more rapid decrease in free and bound testosterone level in blood of orchietomized animals after transplantation.

Conclusions

Thus, basing on indices for testosterone content in the medium and blood serum, as well as on histological analysis of transplants, we can conclude about the suppression of testosterone production of TOCAR under its co-culturing with OCAGAR and pituitary. This inhibition was demonstrated during co-transplantation as well. However the co-transplantation of TOCAR and OCAGAR, cultured separately, resulted in a considerable increase in testosterone concentration in blood of experimental animals. Histological investigations in the transplants, procured to the 20th day, testify to the presence of different stages in the rejection process in all studied cases.

References

1. *Potikha O.P., Chelnakova I.S., Turchin I.S.* Auto- and xenotransplantation of testes organ cultures to castrated rats and to those with experimental hypogonadotropism // Fiziologichnyj zhurnal.– 1993.– Vol. 39, N5-6.– P. 70-75.
2. *Tronko N.D., Bogdanova T.I., Turchin I.S.* Ultrastructural characteristics of organ cultures of newborn piglets' adrenal glands // Endokrinologiya.– 1988.– Vol. 34, N5.– P. 65-69.
3. *Turchin I.S.* Problems of transplantation of cell and tissue cultures of internal glands to the patients with different forms of endocrinopathy // Endokrinologiya.– 1996.– Vol. 1, N2.– P. 6-13.
4. *Chatani F., Nonoyama T., Sudo K. et al.* Stimulatory effect of luteinizing hormone on the development and maintenance of 5 alpha-reduced steroid-producing testicular cell tumors in Fischer 344 rats // Anticancer Res.– 1990.– Vol. 10.– P. 337-342.
5. *Davalli A.M., Maffi P., Socci C.* Insights from a successful case of intrahepatic islet transplantation into a type 1 diabetic patient // J. Clin. Endocrinol. Metab.– 2000.– Vol. 85.– P. 3847-3852.
6. *Ferguson S.S., Morita Y.* RNA synthesis and adrenocortical responsiveness // Biochim. Biophys. Acta.– 1964.– Vol.87.– P. 348-350.

biosynthesis *in vitro* //Biology of reproduction.– 1982.– Vol. 27.– P. 1138-1146.

Поступила 17.05.2004

7. *Hales D.B., Payne A.H.* Glucocorticoid-mediated repression of P450_{scc} mRNA and de novo synthesis in cultured Leydig cells // *Endocrinology*.– 1989.– Vol. 124.– P. 2099-2104.
8. *Lan P., Yan L., Xiao L.* Induction of islet transplantation tolerance with anti-CD4, anti-CD8 immunotoxins and donor soluble antigen // *Chin. Med. J. (Engl)*.– 1999.– Vol. 112.– P. 1109-1111.
9. *Lopez-Lozano J.J., Brera B., Abascal J., Bravo G.* Preparation of adrenal medullary tissue for transplantation in Parkinson's disease: a new procedure. Technical note // *J. Neurosurg.*– 1989.– Vol. 71.– P. 452-454.
10. *O'shaughnessy P.J., Payne A.H.* Differential effects of single and repeated administration of gonadotropins on testosterone production and steroidogenic enzyme in Leydig cells populations // *J. Biol. Chem.*– 1982.– Vol. 257.– P. 11503-11509.
11. *Welsh J.T.H., Bambino T.H., Hsueh A.J.W.* Mechanism of glucocorticoid-induced suppression of testicular androgen biosynthesis *in vitro* // *Biology of reproduction*.– 1982.– Vol. 27.– P. 1138-1146.

Accepted in 17.05.2004