

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.

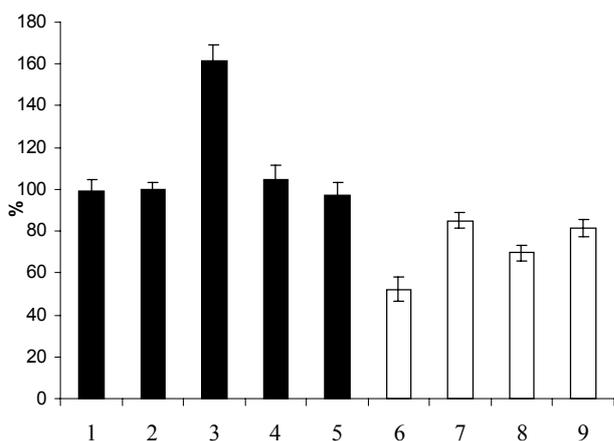
Для трансплантации использовали КОКННП, выращенную по стандартной методике [2] и криоконсервированную по двухэтапной программе под защитой 5%-го димексида [6]. Осуществляли КТ адrenaл-эктомированным (АЭ) и ложнооперированным (ЛЮ) крысам через 30 сут после адrenaлэктоми. Животным трансплантировали КОКННП, 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% Me<sub>2</sub>SO 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 30<sup>th</sup> 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 30<sup>th</sup> 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  $\mu$ l 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  $0.254 \pm 0.016$  до  $0.475 \pm 0.014$  мкг/мг белка у ЛО с КТ по сравнению с  $0.801 \pm 0.019$  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  $0.254 \pm 0.016$  to  $0.475 \pm 0.014$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  of protein in PO rats with XT, comparing to  $0.801 \pm 0.019$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  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 надниркових 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<sup>b</sup> 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. 2<sup>nd</sup> 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

семенников, хранившихся 1 мес., свидетельствуют об одинаковой секретирующей способности криоконсервированного материала на протяжении данных сроков хранения, значит, можно создавать его запасы для последующего использования в клинике.

Цель данной работы - исследование способности размороженного эндокринного материала к секреции тестостерона после низкотемпературного хранения и утилизации экзогенного холестерина - косвенного свидетельства наличия процессов стероидогенеза.

Получение, криоконсервирование органной культуры семенников новорожденных поросят и определение гормонов осуществляли, как описано в [1]. Выбор показателей для тестирования органной культуры обусловлен тем, что клетки Лейдига (основная популяция ткани семенников) синтезируют и секретируют в кровь тестостерон, являющийся основным гормоном данной эндокринной железы. Его синтез и секреция контролируются лютеинизирующим гормоном (ЛГ). Предшественником стероидогенеза тестостерона является холестерин. Для процессов стероидогенеза существенное значение имеет сохранение морфофункциональных характеристик плазматической мембраны клеток Лейдига с поверхностью рецепторов, ответственных за связывание с ЛГ.

В результате проведенных экспериментов нами было установлено, что при низкотемпературном хранении в течение 1-30 сут. секретирующая способность органной культуры семенников была на уровне 79,36 - 80,86 нМ/мг белка тестостерона, что составляло примерно 80 % от уровня секреции тестостерона органной культурой семенников до замораживания. Следует также отметить, что рекультивирование размороженного материала показало его способность к стероидогенезу и секреции тестостерона. В первые 2-е суток отмечались несколько меньшая выработка и секреция тестостерона, однако к 3-4-м суткам рекультивирования нативные и криоконсервированные культуры практически не отличались по их способности секретировать тестостерон.

Из представленных на рисунке данных по утилизации холестерина нативными и криоконсервированными органными культурами семенников видно, что с увеличением времени инкубации происходит снижение количества холестерина, а это может быть свидетельством развития процессов стероидогенеза. Следует указать, что на начальных этапах инкубирования изменения уровня холестерина в средах, содержащих нативные культуры, были более выраженными. Однако к 150-й минуте криоконсервированные органные культуры начинают несколько опережать нативные, т.е. они перерабатывают больше холестерина за одинаковый промежуток времени. Возможно, это обусловлено тем, что на начальных этапах, когда клетки после отогрева имели уменьшенный объем, в них происходили репаративные процессы, направленные на восстановление объема. При достижении определенного объема включались процессы, связанные с непосредственным выполнением функциональных особенностей секретирующих клеток. И, по всей видимости, в результате низкотемпературного воздействия произошли изменения, связанные с большей доступностью холестерина для участия в процессах стероидогенеза. Обработка культур экстрактом гипофиза, содержащим

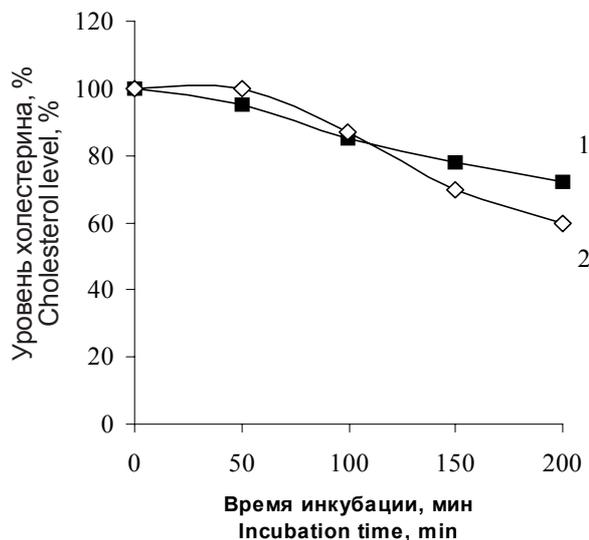
storage terms, so these stocks for the following usage in clinic can be established.

The aim of this work was to investigate the capability of frozen-thawed endocrine material to testosterone secretion after low temperature storage and to exogenous cholesterol utilisation, that is an indirect evidence of the presence of steroidogenesis processes.

Obtaining, cryopreservation of testes' organ culture of newborn piglets and the hormone determination were carried-out as described in the paper [1]. The choice of indices for organ culture testing is stipulated by the fact that the Leydig cells (main population of testes tissue) synthesise and secrete testosterone into the blood, that is the basic hormone of this endocrine gland. Its synthesis and secretion are controlled by luteinizing hormone (LH). Cholesterol is the precursor of testosterone steroidogenesis. For steroidogenesis processes the preservation of morphofunctional characteristics of Leydig cells plasmatic membrane with the receptors surface, responsible for the binding with LH, is of great importance.

As a result of the experiments conducted we have found, that under low temperature storage during 1-30 days a secreting capability of testes organ culture was at the level of 79,36-80,86 nM/mg of testosterone protein, that made approximately 80% of the level of testosterone secretion by testes organ culture before freezing. It should be also noted, that the reculturing of frozen-thawed material demonstrated its capability to steroidogenesis and testosterone secretion. In the first 2 days we noted a quite lower production and secretion of testosterone, although to the 3<sup>rd</sup> -4<sup>th</sup> day the reculturing of native and cryopreserved culture did not practically differ by their capability to secrete testosterone.

As it is seen from the data on cholesterol utilisation by native and cryopreserved testes organ culture, presented in the Figure, with an increase of incubation time there is a decrease in cholesterol number, and this fact can testify to the development of steroidogenesis processes. It should be noted, that at the initial stages of incubation, the changes in



Уровень суммарного холестерина в среде культивирования органной культуры семенников: 1 – нативная; 2 – криоконсервированная. За 100 % принят уровень холестерина в среде до момента инкубации при 37°C.

Level of total cholesterol in culturing medium of testes organ culture: 1 – native one; 2 – cryopreserved one. The cholesterol level in the medium prior to the incubation moment at 37°C was assumed by us as 100%.

ЛГ, приводила к увеличению потребления холестерина на 8 % для нативных и 9 % для криоконсервированных органных культур семенников, а это являлось подтверждением того, что криоконсервирование сохраняет и способность эндокринного материала реагировать на стимулятор стероидогенеза, что важно для материала, используемого для трансплантации.

#### Литература

1. Абу Жаяб Салех, Луговой С.В., Губина Н.Ф. Влияние криоконсервирования на секрецию тестостерона органоидной культурой семенников крыс // Патогенетичні аспекти фармакоterapiї ендокринних захворювань.– Харків, 2002.– С. 17-18.
2. Золотухина В.М., Тарасенко Н.Е. Нові пропозиції негормональної корекції порушеного сперматогенезу // Патогенетичні аспекти фармакоterapiї ендокринних захворювань.– Харків, 2002.– С.46.
3. Лучицький С.Б., Кобяков С.К., Зубкова Г.А. та ін. Імуногенність та функціональна активність органоїд ксенкультури сім'яників // Трансплантологія.– 2000. – Т.1, № 1.– С. 159-160.

Поступило 2.04.2002

cholesterol level in the media, containing native cultures, were more manifested. However to the 150<sup>th</sup> min the cryopreserved organ cultures begin to slightly outstrip of the native ones, i.e. they process the greater number of cholesterol for the same time period. This is possibly stipulated by the fact, that at the initial stages, when the cells after thawing had a reduced volume, the reparative processes, orientated to the volume recovery, occurred in them. When reaching a certain volume there was the triggering of the processes, related to the direct realisation of functional peculiarities of secreting cells. As well, apparently, as a result of a low temperature effect there were the changes, related to the higher availability of cholesterol for participation in steroidogenesis processes. Culture treatment with LH containing hypophysis extract, resulted in an increase in cholesterol consumption by 8% for native and 9% for cryopreserved testes organ cultures, that confirmed the fact, that cryopreservation preserved the capability of endocrine material to respond to steroidogenesis stimulator, that was quite important for the material used for transplantation.

#### References

1. Abujayyab Saleh, Lugovoj S.V., Gubina N.F. Cryopreservation effect on testosterone secretion by rat's testes organ culture // Patogenetychni aspekty farmakoterapii endokrynnykh zakhvoryuvan'.– Kharkiv, 2002.– P.17-18.
2. Zolotukhina V.M., Tarasenko N.E. New proposals of non-hormonal correction of disordered spermatogenesis // Patogenetychni aspekty farmakoterapii endokrynnykh zakhvoryuvan'.– Kharkiv, 2002.– P. 46.
3. Luchyts'ky S.B., Kobayakov S.K., Zubkova G.A. et al. Immunogeneity and functional activity of testes organ xenoculture // Transplantologiya.– 2000.– V.1, N1.– P. 159-160.

Accepted in 2.04.2002

УДК 615.361.811.013.014.413: 57.043.085.2

UDC 615.361.811.013.014.413: 57.043.085.2

## Влияние гипотермического хранения эмбриональной нервной ткани крыс на жизнеспособность клеток после замораживания-отогрева

М.С. ПЛАЧИНТА, А.Н. СУКАЧ, К.В. БЕЗРУКОВА

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Effect of Hypothermic Storage of Rat's Embryonic Nerve Tissue on Cell Viability After Freeze-Thawing

PLACHINTA M.S., SUKACH A.N., BEZRUKOVA K.V.

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

Открытие стволовых клеток, которые могут воспроизводить нервную ткань, предоставило новые возможности для лечения поврежденной нервной системы. Для создания банков эмбриональных нервных клеток (ЭНК) их криоконсервируют при температуре жидкого азота. Однако криоконсервированию предшествуют процессы получения эмбрионов, выделения из них нервной ткани и ее дезагрегации на единичные клетки. Все эти процессы, как правило, проводятся в гипотермических условиях и приводят к значительному падению жизнеспособности клеток, и, следовательно, к уменьшению эффективности их трансплантации. Цель работы - изучение влияния гипотермического хранения эмбриональной нервной

Discovery of stem cells, capable of reproducing nerve tissue, provided the new opportunities for treating nervous system damages. In order to establish the banks of embryonic neuronal cells (ENCs), they are cryopreserved under liquid nitrogen temperature. However the processes of embryos obtaining, nerve tissue isolation from them and its desaggregation for single cells precede the cryopreservation. All these processes, as a rule, are carried-out under hypothermic conditions and result in a considerable decrease of viable cells, and, consequently, in a reduction in their transplantation efficiency. The aim of work was to study the effect of hypothermic storage of rat's embryonic nerve tissue on cell viability before and after freezing.

ткани крыс на жизнеспособность клеток до и после замораживания.

Нервную ткань получали из эмбрионов крыс 12-18 дней гестации и хранили в гипотермических условиях при температуре 4°C в сахарозосодержащей среде в течение фиксированных промежутков времени 0; 1 и 3 ч, после чего получали ЭНК по разработанному нами методу [1]. Количество клеток подсчитывали до и после криоконсервирования в камере Горяева. Морфометрические параметры клеток определяли при помощи микроскопа, соединенного видеокамерой с компьютером. Жизнеспособность ЭНК определяли по прокрашиванию витальным красителем трипановым синим. Клетки замораживали по оптимальной программе: быстрое экспоненциальное охлаждение с остановкой при -25°C до температуры жидкого азота (-196°C) в присутствии 10%-го ДМСО [2]. В жидком азоте пробы хранились от 3-х до 7 суток. После размораживания определяли жизнеспособность клеток и контролировали их морфометрические параметры. Размораживали клетки при температуре 40°C.

Результаты проведенных экспериментов (рисунок) указывают на то, что гипотермическое хранение ЭНК приводит к падению их жизнеспособности через 1 ч хранения на 20, через 3 ч - на 28%. Однако результаты, полученные после криоконсервирования этих клеток, указывают на более высокую криоустойчивость клеток, подвергнутых гипотермическому хранению в сравнении со свежевыделенными. Так, если замораживание-отогрев свежевыделенных ЭНК приводит к падению их жизнеспособности на 44%, то замораживание-отогрев ЭНК после 1-го часа гипотермического хранения - на 70%, а после 3-х часов хранения - на 83% по сравнению с их исходной жизнеспособностью. Данные результаты можно объяснить тем, что гипотермическое хранение приводит к накоплению в клетках нелетальных повреждений, которые реализуются в результате замораживания-отогрева, что влечет их гибель.

Проанализировав влияние замораживания-отогрева на образцы клеток с высокой (от 65 до 73 %) и низкой (от 29 до 51%) исходной жизнеспособностью, было выяснено, что у ЭНК с исходно низкой жизнеспособностью относительная криоустойчивость клеток значительно выше, чем в образцах с высокой исходной жизнеспособностью. Это можно объяснить тем, что в пробах с низкой исходной жизнеспособностью произошла селекция наиболее жизнеспособных, устойчивых к действию неблагоприятных факторов клеток.

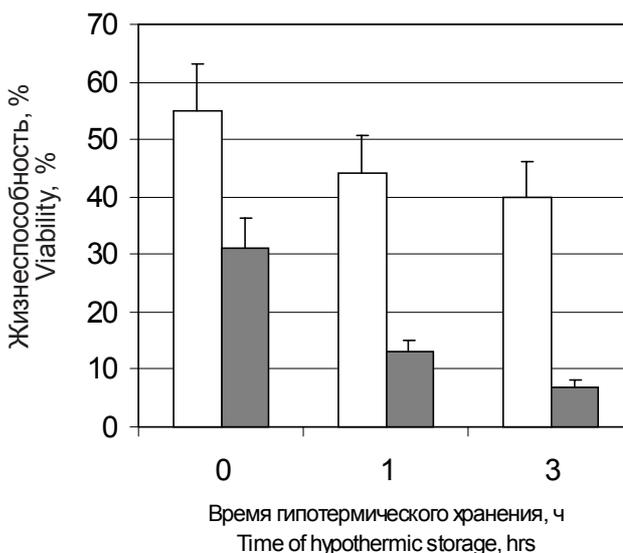
Морфометрическое исследование ЭНК показало, что в процессе гипотермического хранения средние размеры клеток уменьшались: через 1 ч хранения - до 80, а через 3 ч - до 75% от исходных. Это объясняется влиянием на клетки осмотически активного раствора сахарозы. Замораживание-отогрев ЭНК приводит к увеличению их средних размеров приблизительно до 115% от исходных, что указывает на возрастание в суспензии клеток количества повреждений плазматической мембраны.

Проведенные исследования указывают на накопление в ЭНК нелетальных повреждений в процессе

Nerve tissue was obtained from rats' embryos of the 12<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> gestation day and stored under hypothermic conditions at 4°C temperature in a sucrose-based solution within fixed time intervals of 0; 1 and 3 hours, after that the ENC's were obtained by the developed by us method [1]. Cell number was calculated before and after cryopreservation in Goryaev's chamber. Morphometric parameters of cells were determined using the microscope, connected by video camera with computer. The ENC's viability was determined by staining with trypane blue vital dye. Cells were frozen by an optimal program: rapid exponential cooling with a stop at -25°C down to the temperature of liquid nitrogen (-196°C) at the presence of 10% DMSO [2]. Samples were stored in liquid nitrogen from 3 to 7 days. After freeze-thawing we determined cell viability and controlled their morphometrical parameters. Cells were frozen-thawed under the temperature of 40°C.

The results of the experiments conducted (Figure) point to the fact, that ENC's hypothermic storage results in a decrease of their viability in 1 hour of storage by 20, in 3 hours by 28%. However the results, obtained after these cells cryopreservation show a higher cryosensitivity of the cells, subjected to hypothermic storage in comparison with the freshly isolated ones. So, if the freeze-thawing of freshly isolated ENC's results in a reduction of their viability by 44%, then the ENC's freeze-thawing after an hour's hypothermic storage: by 70%, after 3 hours of storage: by 83% in comparison with their initial viability. These results can be explained by the fact, that hypothermic storage gives a rise to the accumulation in cells of non-lethal damages, realised as a result of freeze-thawing, that leads to their death.

After the analysis of freeze-thawing effect on cell samples with a high (from 65 to 73%) and low (from 29 to 51%) initial viability, we found out that in ENC's with initially low viability a relative cell cryoresistance was considerably higher, than in those with a high initial viability. It can be explained by the fact, that in the samples with low initial viability there was the selection of the cells, which were the most viable and resistant to the effect of unfavourable factors.



Влияние гипотермического хранения эмбриональной нервной ткани крыс на жизнеспособность ЭНК после замораживания-отогрева: □ - натив, ■ - замораживание-отогрев.  
Effect of hypothermic storage of rat's embryonic nerve tissue on ENC's viability after freeze-thawing: □ - native, ■ - freeze-thawing.

гипотермического хранения нервной ткани, что приводит к их гибели после замораживания-отогрева.

#### Литература

1. Сукач А.Н., Петренко А.Ю., Плачинта М.С. Криоконсервирование эмбриональных нервных клеток крысы с использованием ДМСО // Пробл. криобиологии.– 2001.– №3.– С. 61-62.
2. Петренко А.Ю., Грищук В.П. Влияние замораживания-отогрева под защитой диметилсульфоксида на сохранность изолированных гепатоцитов крыс // Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов.– Харьков, 1990.– С. 109-114.

Поступило 16.04.2002

ENCs morphometrical study has shown, that during the process of hypothermic storage average sizes of cells reduced in such a way: in 1 hour of storage – down to 80, and in 3 hours – down to 75% of initial ones. This is explained by the effect on cells of the osmotically active sucrose solution. ENCs freeze-thawing resulted in an increase in their average sizes approximately up to 115% of initial ones, that pointed to the augmentation of a number of plasmatic membrane damages in a suspension.

The studied damages indicate the accumulation in INC of non-lethal damages during the process of nerve tissue hypothermic storage, that results in their death after freeze-thawing.

#### References

1. Sukach A.N., Petrenko A.Yu., Plachinta M.S. Cryopreservation of rat embryonic neuronal cells using DMSO // Problems of Cryobiology.– 2001.– N3.– P.61-62.
2. Petrenko A.Yu., Grischuk V.P. Effect of freeze-thawing under dimethyl sulfoxide protection on viability of isolated rat hepatocytes // Physical and chemical properties and biological effects of cryoprotectants.– Kharkov, 1990.– P.109-114.

Accepted in 16.04.2002

УДК 577.352.465:612.111

UDC 577.352.465:612.111

## Модификация транспорта ионов $H^+$ и связывания дипиридамола с мембранами эритроцитов крысы при гипертоническом воздействии

А.Н. БАЛАКИРЕВ, Ф. АБУ-АЛЬ АСАЛЬ, В.В. РАМАЗАНОВ

Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, г. Харьков

## Modification of $H^+$ Ion Transport and Binding of Dipyridamol with Membranes of Rat's Erythrocytes under Hypertonic Effect

BALAKIREV A.N., ABU-AL ASAL F., RAMAZANOV V.V.

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

Обмен внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат в эритроцитах человека осуществляется по двум механизмам: выход хлорида и протона по каналу и обмен внутриклеточного хлорида на сульфат и протон [3]. При этом происходит закисление среды с последующим ее защелачиванием. Фаза закисления менее чувствительна к ингибиторам, изменениям температуры и гипертоническому воздействию [1]. Цель работы – выявить характер обмена хлорида на сульфат в эритроцитах крысы.

В эксперименте использовали эритроциты крови крыс, полученные декапитацией 18-месячных животных. Отмытые эритроциты с гематокритом 70 % разводили до 20 % средой, содержащей (ммоль/л): KCl – 90, NaCl – 45, сахарозы – 44, триса – 10, pH 7,4, добавляли ДИДС в конечной концентрации 50 мкмоль/л, суспензию клеток инкубировали 60 мин при 37°C. После обработки эритроциты отмывали средой инкубации. В термостатируемую ячейку с pH электродом, содержащую сульфатные среды, вносили эритроциты и изменения pH контролировали самописцем. Белые тени получали с помощью лизиса эритроцитов на ледяной бане в среде, содержащей 1 ммоль/л ЭДТА, 5 ммоль/л триса, pH 8 в течение 10 мин. Полученный гемолизат центрифугировали при 4°C на центрифуге в течение 15 мин при 15000 об/мин. Осадок отмывали 4 раза

Exchange of intracellular chloride to extracellular sulphate in human erythrocytes is accomplished by two mechanisms: release of chloride along the channel and the exchange of intracellular chloride for sulphate and proton [3]. In this case the medium pH changes by such a way, that the phase of acidification is less sensitive than the phase of alkalisation to the inhibitors, changes of temperature and hypertonic effect [1]. The aim of the work is to reveal the character of chloride exchange to sulphate in rat's erythrocytes.

In the experiment we used erythrocytes of rat's blood, obtained after decapitation of 18 months' animals. Washed-out with 70% hematocrit erythrocytes were diluted down to 20% with the medium, containing: KCl – 90 mM/l, NaCl – 45, sucrose – 44, tris - 10, pH 7.4, DIDS was added under final concentration of 50 mcM/l, cell suspension was incubated for 60 min at 37°C. After the treatment the erythrocytes were washed-out with incubation medium. The erythrocytes were placed into a thermostated well with pH electrode, containing sulphate media and the changes in pH were controlled with a recorder. White ghosts were obtained by lysis of erythrocytes on ice bath in the medium, containing 1 mM/l EDTA, 5 mM tris, pH 8 during 10 min. Obtained hemolysate was centrifuged at 4°C by the centrifuge during 15 min at 1500 rot/min. The sediment

гемолизирующей средой. Полученные белые тени хранили на льду не более 30 мин до эксперимента. Интенсивность роста поляризации флуоресценции дипиридамола измеряли при титровании его белыми тенями эритроцитов во флуориметрической кювете. Содержание белка в белых тенях эритроцитов определяли методом Лоури.

ДИДС и дипиридамола в использованных концентрациях в изотонической сульфатной среде не блокируют выхода протонов из клетки, тогда как вход блокируется на 57 и 63% соответственно (таблица). Гипертонические среды вызывают блокирование как выхода, так и входа протонов и индуцируют ингибиторное действие дипиридамола при выходе протонов из клетки. При транспорте протонов в клетку рост степени ингибирования отражает аддитивное действие блокаторов и гипертонических сред. Титрование дипиридамола тенями эритроцитов вызывает рост поляризации флуоресценции как в изотонической, так и в гипертонической сульфатной средах. Однако в гипертонической среде степень поляризации флуоресценции выше, чем в изотонической (рисунок). Титрование тенями, полученными из ДИДС обработанных эритроцитов, приводит к редукции нарастания поляризации флуоресценции дипиридамола в гипертонической сульфатной среде. Если среда инкубации, наряду с изотоническим сульфатом, содержала гипертоническую сахарозу, то это значительно подавляло рост поляризации дипиридамола при титровании его тенями контрольных эритроцитов.

Полученные результаты показывают, что выход  $H^+$  не чувствителен к ингибиторам по сравнению с его входом. В [1] отмечалось, что обмен внутриклеточного хлорида на внеклеточный сульфат для эритроцитов человека осуществляется по двум механизмам: каналному и обменному, что, вероятно, характерно и для эритроцитов крысы. Использование гипертонических сред индуцирует ингибиторное действие дипиридамола на выход протонов из клетки (таблица), однако только гипертоническая сульфатная среда вызывает рост степени поляризации флуоресценции дипиридамола с тенями, а гипертоническая сахарозная среда редуцирует этот показатель (рисунок). Такой результат указывает на то, что рост ионной силы приводит к увеличению связывания дипиридамола с анионным каналом, однако рост осмотического градиента на мембране также является весомым фактором в изменении ингибиторной силы данного блокатора.

Полученные результаты после обработки эритроцитов ДИДС указывают, что остаточная поляризация флуоресценции дипиридамола в изотонической сульфатной среде обусловлена связыванием его не с анионным каналом, а с поверхностью мембраны. Незначительное влияние гипертонической сульфатной

Степень блокирования (%) транспорта ионов  $H^+$  в эритроцитах, находящихся в различных средах

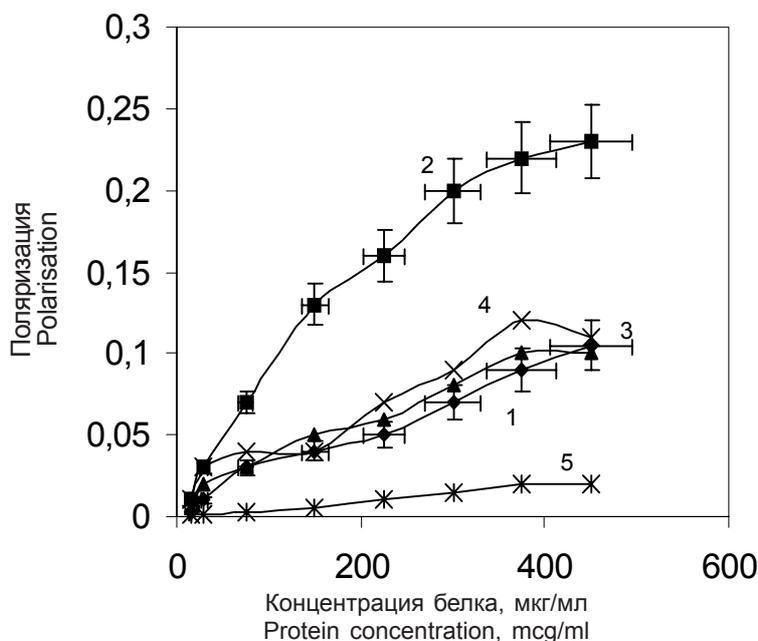
Blockage rate (%) of  $H^+$  ion transport in erythrocytes being in various media

Транспорт ионов $H^+$ $H^+$ ions transport	Ингибиторы Inhibitors	0,12 M $Na_2SO_4$	1 M $Na_2SO_4$	0,12 M $Na_2SO_4$ + 0,86 M сахарозы/ sucrose
Из клетки Out of a cell	Контроль Control	-	39±6	33±5
	Дипиридамола (300 мкмоль/л) Dipyridamol (300 mcmol/l)	0	76±9	62±7
	ДИДС (0,5 мкмоль/л) DIDS (0.5 mcmol/l)	0	52±8	31±4
В клетку Into a cell	Контроль Control	-	44±6	51±6
	Дипиридамола (300 мкмоль/л) Dipyridamol (300 mcmol/l)	63±7	88±6	86±7
	ДИДС (0,5 мкмоль/л) DIDS (0.5 mcmol/l)	57±8	82±6	82±8

was washed-out 4 times with hemolysing medium. Resulted white ghosts were stored on ice not more than 30 min before the experiment. The intensity of the growth of dipyridamol fluorescence polarisation was measured during its titration by white ghosts of erythrocytes in fluorimetric cuvette. Protein content in white ghosts of erythrocytes was determined with Loury method.

DIDS and dipyridamol of the used concentrations in isotonic sulphate medium do not block the release of protons out of a cell, meanwhile the entering is blocked by 57 and 63%, correspondingly (Table). Hypertonic media cause the blocking of both release and entering of protons and induced inhibitory effect of dipyridamol at the proton release out of a cell. During the transport of protons into a cell the growth of inhibition degree reflects an additive effect of blockers and hypertonic media. Titration of dipyridamol with the ghosts of erythrocytes causes the growth of fluorescence polarisation both in isotonic and hypertonic sulphate media. However in hypertonic medium the degree of fluorescence polarisation is higher than in isotonic one (Figure). Titration by the ghosts, obtained from DIDS-treated erythrocytes, results in the reduction of accumulation of dipyridamol fluorescence polarisation in hypertonic sulphate medium. If incubation medium along with isotonic sulphate contained hypertonic sucrose, then this considerably suppressed the growth of dipyridamol polarisation during its titration by the ghosts of the control erythrocytes.

The obtained results demonstrate that the  $H^+$  releasing phase is not sensitive to the inhibitors in comparison with the one of  $H^+$  entering. The paper [1] showed that the exchange of intracellular chloride to extracellular sulphate for human erythrocytes is accomplished by two mechanisms: channel and exchange, that is characteristic for rat's erythrocytes. Usage of hypertonic media induces an inhibitory effect



Рост поляризации флуоресценции дипиридамола в различных средах (моль/л) при титровании белыми телями эритроцитов:

1 – 0,12 сульфата натрия; 2 – 1,0 сульфата натрия; 3 – 0,12 сульфата натрия (обработка ДИДС); 4 – 1,0 сульфата натрия (обработка ДИДС); 5 – 0,12 сульфата натрия и 0,86 М сахарозы.

Polarisation growth of dipyrindamol fluorescence in various media (M/l) during titration with white ghosts of erythrocytes:

1 – 0.12 sodium sulphate; 2 – 1.0 sodium sulphate; 3 – 0.12 sodium sulphate (DIDS treatment); 4 – 1.0 sodium sulphate (DIDS treatment); 5 – 0.12 sodium sulphate and 0.86 M sucrose

среды на действие ДИДС, видимо, обусловлено тем, что он связывается только с анионным каналом и с более высоким сродством, чем дипиридамола [2].

Таким образом, комбинирование эритроцитов крысы с незабуференной сульфатной средой вызывает её закисление с последующей фазой защелачивания. При этом фаза закисления менее чувствительна к ингибиторам анион-транспортной системы, чем фаза защелачивания. Гипертоническое воздействие стимулирует ингибиторную силу дипиридамола на фазу закисления. Гипертоническая сульфатная среда вызывает больший рост поляризации флуоресценции дипиридамола в присутствии телей эритроцитов, тогда как гипертоническая сахарозная среда подавляет рост данного показателя.

#### Литература

1. Рамазанов В.В., Лупилова Н.А., Тодрин А.Ф., Бондаренко Т.П. Осмотическая модификация транспорта протонов в эритроцитах в сульфатной среде // Пробл. криобиологии. – 1999. – №4. – С. 34-41.
2. Cabantchik Z.J., Knauf P.A., Rostein A. The anion transport system of the red blood cell // Biochem. Biophys. Acta. – 1978. – V.515. – P. 239-302.
3. Red cell membranes - a methodological approach / Eds. Ellory J.C., Young J.D. – Academic press, 1982. – 369 p.

Поступило 26.03.2002

of dipyrindamol on the release of protons out of a cell (Table), but only hypertonic sulphate medium causes the growth of the degree of dipyrindamol fluorescence polarisation with the ghosts and hypertonic sucrose medium reduces this index (Figure). Such a result points to the fact that the growth of ionic strength results in an increase in dipyrindamol binding with anion channel, however the growth of osmotic gradient on membrane is also powerful factor in the change of inhibitory strength of this blocker.

The obtained results after the treatment of erythrocytes with DIDS show that residual polarisation of dipyrindamol fluorescence in isotonic sulphate medium is stipulated by its binding not with anion channel but the surface of membrane. A slight effect of hypertonic sulphate medium on DIDS effect is likely stipulated by the fact, that it binds only with anion channel and with higher affinity than dipyrindamol [2].

Thus the combination of rat's erythrocytes with non-buffered sulphate medium causes its acidification with the following alkalisation phase. In this case the phase of acidification is less sensitive to the inhibitors of anion-transport system that the phase of alkalisation. Hypertonic effect stimulates an inhibitory strength of dipyrindamol on the phase of acidification. Hypertonic sulphate medium causes a larger growth of dipyrindamol fluorescence polarisation in the presence of erythrocyte ghosts, meanwhile hypertonic sucrose medium suppresses the rise in this index.

#### References

1. Ramazanov V.V., Lupilova N.A., Todrin A.F., Bondarenko T.P. Proton transport osmotic modification in erythrocytes in a sulphatic medium // Problems of Cryobiology. – 1999. – N4. – P. 34-41.
2. Cabantchik Z.J., Knauf P.A., Rostein A. The anion transport system of the red blood cell // Biochem. Biophys. Acta. – 1978. – V.515. – P. 239-302.
3. Red cell membranes - a methodological approach / Eds. Ellory J.C., Young J.D. – Academic press, 1982. – 369 p.

Accepted in 26.03.2002