

УДК 612.617-084:615.014.41:539.21-022.532:546.59

Н.О. Волкова\*, М.С. Юхта, Л.Г. Чернишенко,  
Л.В. Степанюк, Л.В. Сокол, А.М. Гольцев

## Експозиція звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів у кріозахисних середовищах різного композиційного складу

UDC 612.617-084:615.014.41:539.21-022.532:546.59

N.O. Volkova\*, M.S. Yukhta, L.G. Chernyshenko,  
L.V. Stepanyuk, L.V. Sokol, A.M. Goltsev

## Exposure of Seminiferous Tubules of Immature Rats to Cryoprotective Media of Various Compositions

**Реферат:** Розробка нових методологічних підходів, спрямованих на збереження потенційної фертильності під час планування цитотоксичної терапії у осіб допубертатного віку, є актуальним напрямком медико-біологічних досліджень. У роботі проведено порівняльну оцінку впливу експозиції у середовищах різного композиційного складу на морфологічні параметри та метаболічну активність клітин звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів. Кріоконсервування тканин яєчка вимагає застосування відповідних протоколів, які забезпечують високі показники життєздатності та функціональної активності на тлі мінімізації пошкоджень трансплантаційного матеріалу. Встановлено, що 30-хвилинна експозиція зразків тканин у середовищах на основі розчину Хенкса та 50 г/л бичачого сироваткового альбуміну з додаванням 0,6 М диметилсульфоксиду (ДМСО) або 0,7 М гліцерину не викликала ушкоджень сперматогенного епітелію та зниження метаболічної активності клітин (МТТ-тест та активність лактатдегідрогенази). Експозиція впродовж 45 та 60 хв у середовищах із додаванням 0,6 М ДМСО, 0,7 М гліцерину, 50 г/л поліетиленоксиду-400 та 0,1 М сахарози призводила до десквамації, появи безклітинних ділянок, зниження щільності клітин сперматогенного епітелію та їх метаболічної активності. Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки ефективних методик кріоконсервування звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів.

**Ключові слова:** звіті каналця сім'яників, статевонезрілі щури, диметилсульфоксид, гліцерин, поліетиленоксид, сахароза, бичачий сироватковий альбумін.

**Реферат:** Разработка новых методологических подходов, направленных на сохранение потенциальной фертильности при планировании цитотоксической терапии у лиц допубертатного возраста, является актуальным направлением медико-биологических исследований. В работе проведена сравнительная оценка влияния экспозиции в средах различного композиционного состава на морфологические параметры и метаболическую активность клеток извитых канальцев семенников неполовозрелых крыс. Кріоконсервирование тканей яєчка требует применения соответствующих протоколов, которые обеспечивают высокие показатели жизнеспособности и функциональной активности на фоне минимизации поврежденный трансплантационного материала. Установлено, что 30-минутная экспозиция образцов ткани в кріозащитных средах на основе раствора Хенкса и 50 г/л бычьего сывороточного альбумина с добавлением 0,6 М ДМСО или 0,7 М глицерина не приводила к повреждениям сперматогенного эпителия и снижению метаболической активности клеток (МТТ-тест и активность лактатдегідрогеназы). Экспозиция в течение 45 и 60 мин в средах с добавлением 0,6 М ДМСО, 0,7 М глицерина, 50 г/л полиетиленоксида-400 и 0,1 М сахарозы приводила к десквамации, появлению безклеточных участков, снижению плотности клеток сперматогенного эпителия и их метаболической активности. Полученные данные могут быть использованы для обоснования и разработки эффективных методик кріоконсервирования извитых канальцев семенников неполовозрелых крыс.

**Ключевые слова:** извитые канальца семенников, неполовозрелые крысы, диметилсульфоксид, глицерин, полиетиленоксид, сахароза, бычий сывороточный альбумин.

**Abstract:** The development of new methods aimed at preserving potential fertility before the cytotoxic therapy for individuals of pre-adulthood is an actual area of medical and biological research. The research compares the effect of exposure to media of different composition on morphological parameters and metabolic activity of cells of testicular convoluted tubules of sexually immature rats. Cryopreservation of testicular tissues requires the use of appropriate protocols, ensuring the high viability and functional activity at the background of minimization of damages in transplant material. It has been established that a 30-minute exposure of the tissue samples in media based on Hanks solution and 50 g/L bovine serum albumin supplemented with either 0.6 M DMSO or 0.7 M glycerol did not result in the damage of spermatogenic epithelium and to the decrease in metabolic activity of the cells (MTT test and lactate dehydrogenase activity). Exposure of the testicular convoluted tubules of immature rats during 45 and 60 min in cryoprotective media supplemented with 0.6 M DMSO, 0.7 M glycerol, 50 g/L polyethylene oxide with molecular weight 400 and 0.1 M sucrose led to the manifested desquamation, appearance of acellular areas, reduced density of spermatogenic epithelium cells and their metabolic activity. The findings could be used to substantiate and develop the effective techniques for cryopreservation of seminiferous tubules of immature rats.

**Key words:** seminiferous tubules, immature rats, dimethyl sulfoxide, glycerol, polyethylene oxide, bovine serum albumin.

Відділ кріопатофізіології та імунології, Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків

Department of Cryopathophysiology and Immunology, Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

\*Автор, якому необхідно надсилати кореспонденцію:  
вул. Переяславська, 23, м. Харків, Україна 61016;  
тел.: (+38 057) 373-74-35, факс: (+38 057) 373-59-52,  
електронна пошта: volkovana781@gmail.com

\*To whom correspondence should be addressed:  
23, Pereyaslavskaya str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952,  
e-mail: volkovana781@gmail.com

Надійшла 15.05.2017  
Прийнята до друку 30.05.2017

Received May, 15, 2017  
Accepted May, 30, 2017

© 2017 N.O. Volkova et al., Published by the Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Із розвитком біотехнологій та більш глибоким розумінням механізмів регенерації біологічних тканин в останні роки вченими всього світу розробляються підходи до застосування клітинних та тканинних технологій у репродуктивній медицині, андрології та гінекології. Зусилля медиків у цій галузі спрямовані, перш за все, на подолання безпліддя, лікування онкологічних захворювань статевих залоз у чоловіків і жінок, пренатальну корекцію аномалій розвитку плода за допомогою тканинних, клітинних і генних технологій [12, 25, 29].

Безсумнівним підтвердженням прогресу клінічної онкології є збільшення показника виживання хворих на злоякісні новоутворення всіх типів і нозологій. Значна кількість онкологічних пацієнтів, які пройшли протипухлинне лікування, – це особи допубертатного віку, які розраховують на високу тривалість і якість життя [2]. Наразі кріоконсервування сперми та окремих сперматозоїдів досить успішно проводиться з метою збереження фертильності у чоловіків [28]. Однак даний підхід не може бути застосований для пацієнтів допубертатного віку, у яких сперматогенез ще не розвинений, а в еякуляті відсутні сперматозоїди. У зв'язку з цим перед клініцистами постає непросте завдання, яке полягає у розробці нових методологічних підходів, спрямованих на збереження потенційної фертильності під час планування цитотоксичної терапії у осіб даної вікової групи. Вирішенням цієї проблеми може стати кріоконсервування тканин яєчка [8], тому актуальною є розробка протоколів, які здатні забезпечити високі показники функціональної активності та життєздатності на тлі мінімізації пошкоджень трансплантаційного матеріалу.

Існують два варіанти кріоконсервування тестикулярної тканини: у вигляді суспензії герміногенних клітин або фрагментів звитих сім'яних каналців. Після розморожування суспензії герміногенних клітин можлива її ауто трансплантація шляхом ін'єкції у тканину сім'яників для заселення звитих каналців здоровою популяцією сперматогенних клітин [2, 19]. У разі кріоконсервування цілих звитих каналців можливе проведення трансплантації біоптату для ініціації сперматогенезу. Отримані таким чином сперматозоїди можуть бути використані для запліднення за допомогою інтрацитоплазмичної ін'єкції сперми [14]. Крім того, дослідниками активно розглядається можливість індукції сперматогенезу *in vitro*, у тому числі з використанням деконсервованого матеріалу, але ця технологія знаходиться поки на стадії розробки.

Слід зазначити, що під час кріоконсервування тканин яєчка, отриманих від пацієнтів допубертатного віку, коли повноцінний сперматогенез ще не сформувався, основним завданням є не тільки фізичне збереження сперматогоній і клітин Сертолі,

The development of biotechnology and a better understanding of the mechanisms of regeneration of biological tissues allowed the scholars all over the world to develop the approaches to apply the cell and tissue based therapies in reproductive medicine, andrology and gynecology. The efforts of physicians in this field are aimed, above all, at overcoming infertility, treating cancer diseases of the sexual glands in men and women, as well as prenatal correction of fetal abnormalities by means of tissue, cell and gene based technologies [8, 23, 29].

Definite evidence of the progress of clinical oncology is an increased survival of patients with malignant neoplasms of all types and nosologies. A significant number of oncology patients undergoing antitumor treatment are those of a pre-adulthood, hoping for a long active life [5]. Currently cryopreservation of sperm and individual spermatozoa is very successful to maintain fertility in men [28]. However, this approach can not be used for patients of prepubertal age, because their spermatogenesis is not yet developed, and there are no spermatozoa in ejaculate. In this regard, the clinicians face a difficult task, which is to develop new methodological approaches aimed at preserving the potential fertility during planning of cytotoxic therapy in individuals of this age group. Cryopreservation of testicular tissues could solve this problem [3], therefore the development of appropriate protocols is needed, which will provide high levels of functional activity and viability together with minimal transplantation impairments.

There are two options to cryopreserve a testicular tissue: either as a suspension of germinal cells or as the fragments of convoluted spermatid tubules. After thawing the suspension of germinal cells, it can be autotransplanted by injection into testicular tissue to populate the convoluted tubules with a healthy population of spermatogenous cells [5, 15]. If whole convoluted tubules are cryopreserved, the biopsy material may be transplanted to initiate spermatogenesis. Thereby obtained spermatozoa can be used for fertilization by means of intracytoplasmic sperm injection [10]. In addition, researchers are actively considering the possibility of *in vitro* induction of spermatogenesis, including the application of frozen-thawed material, but this technology is still under development.

It should be noted that during cryopreservation of testicular tissue obtained from the pre-pubertal patients with non-active spermatogenesis, the main task is not only physical preservation of spermatogonia and Sertoli cells, but also keeping a proper contact in between, as it plays an important role in further maturation of the spermatogenic epithelium cells. Therefore cryopreservation of testicular tissue as convoluted tubules is considered as a promising method to preserve testicular tissue for its further autotransplantation and restoration



а й повноцінних контактів між ними, оскільки вони відіграють важливу роль у наступному дозріванні клітин сперматогенного епітелію. Тому кріоконсервування тканин яєчка у вигляді звитих каналців вважається перспективним методом збереження тестикулярної тканини з метою подальшої її ауто-трансплантації та відновлення репродуктивної функції [2]. У роботі V. Keros і співавт. [18] показано, що в зразках тестикулярної тканини, кріоконсервованих під захистом 0,6 М диметилсульфоксиду (ДМСО), відсутні порушення зв'язку сперматогоній із базальною мембраною та сусідніми клітинами у порівнянні зі свіжо ізольованою тканиною. F. Izadyar і співавт. [15] у якості кріозахисного середовища також використовували ДМСО, але у концентрації 10%. Це забезпечувало збереження морфологічних показників і функціональної активності сперматогоній при низькотемпературному зберіганні. Однак, незважаючи на те, що ДМСО властива більш виражена цитотоксична дія, деякі автори [18] відмічають, що його застосування у якості кріопротектора (у концентрації 0,7 моль/л) дозволяє зберегти структуру тканини яєчка (особливо сперматогоній) краще, ніж використання 1,2-пропандіолу або гліцерину.

Не зважаючи на оптимістичні результати кріоконсервування тестикулярної тканини, розробка та вдосконалення протоколів низькотемпературного консервування залишаються актуальними напрямками. Слід враховувати, що при виготовленні кріозахисних середовищ на основі ДМСО необхідно знижувати його концентрацію та скорочувати загальний час експозиції. Одним із перших етапів розробки протоколів кріоконсервування тканин є визначення впливу експозиції у кріозахисних середовищах на їх морфологічні та функціональні параметри. На сьогодні гліцерин і ДМСО вважаються класичними кріопротекторами, які використовуються ще з середини минулого століття [10]. З того часу до практики кріоконсервування було введено багато інших ендотекстоцелюлярних кріопротекторів (метанол, пропандіол, етиленгліколь, диметиловий ацетальдегід, сахароза, декстран, полівінілпіролідон, гідроксиетилкрохмаль, ПЕО-400 тощо). Незважаючи на кріозахисний потенціал цих речовин, вони мають ряд побічних ефектів, основним із яких є цитотоксичність. Толерантність тканин до несприятливих умов кріоконсервування обмежена і залежить від типу тканини та її початкового стану. При цьому додавання кріопротекторів до середовищ у різних концентраціях, а також оптимізація часу експозиції можуть знизити їх токсичний вплив на тканину.

Мета роботи – визначення морфологічних змін та метаболічної активності звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів залежно від концентрації кріопротекторів (ДМСО, гліцерину, ПЕО-400

of reproductive function [5]. V. Keros *et al.* [14] reported about the absence of the disorders in binding the spermatogonia with basal membrane and adjacent cells compared to freshly isolated tissue in the samples of testicular tissue cryopreserved under protection of 0.6 M dimethylsulfoxide (DMSO). F. Izadyar *et al.* [11] also used DMSO as a cryoprotective medium, but at 10% concentration, which ensured the preservation of morphological parameters and functional activity of the spermatogonia during their low-temperature storage. However, despite the fact that DMSO has a more pronounced cytotoxic effect, some authors [14] noted that its use as a cryoprotective agent (at a concentration of 0.7 mol/L) allows the tissue structure of the testis (especially spermatogonia) to be preserved better than using 1,2-propane diol or glycerol.

Despite the optimistic results of cryopreservation of testicular tissue the development and improvement of low-temperature preservation protocols is still relevant trend. It is believed that when preparing the cryoprotective media based on DMSO its concentration should be reduced as well as its overall exposure time has to be decreased. One of the first stages of developing the cryopreservation protocols for tissues is to determine the effect of exposure to cryoprotective media on their morphological and functional parameters. Today DMSO and glycerol are considered to be classic cryoprotective agents used since the last midcentury [6]. Since that time numerous endo- and exocellular cryoprotectants (methanol, propane diol, ethylene glycol, dimethyl acetaldehyde, sucrose, dextran, polyvinylpyrrolidone, hydroxyethyl, PEO-400, *etc.*) were also introduced into the practice of cryopreservation. In spite a cryoprotective potential of these agents, they have a number of side effects, the main of which is cytotoxicity. Tolerance of tissues to adverse conditions of cryopreservation is restricted and depends on the type of tissue and its original state. Herewith the addition of cryoprotectants to the media at various concentrations and exposure time optimization can reduce their toxic effects on a tissue.

In connection with the above, the research purpose was to determine morphological parameters and metabolic activity of convoluted tubules of immature rat testes depending on the concentrations of cryoprotectants (DMSO, glycerol, PEO-400 and sucrose) and the time of exposure to cryoprotective solution based on Hanks solution and 50 g/L of bovine serum albumin (BSA).

## Materials and methods

The experiments were carried out in accordance with the General Principles of Experiments in Animals, approved by the 6<sup>th</sup> National Congress in Bioethics (Kyiv, 2016) and with the statements of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals

та сахарози), а також часу їх експозиції у криозахисних розчинах на основі розчину Хенкса та 50 г/л бичачого сироваткового альбуміну.

### Матеріали та методи

Експерименти проводили згідно з «Загальними принципами експериментів на тваринах», схваленими VI Національним конгресом із біоетики (Київ, 2016) та узгодженими з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

Роботу виконували на 50 безпорідних білих ставонезрілих щурах-самцях масою ( $50 \pm 15$ ) г віком 7–8 тижнів. Звіти каналця отримували з обох сім'яників щурів механічним шляхом та поміщали у розчин Хенкса («ПанЕко», Росія). У дослідженнях використовували навіски звитих сім'яних каналців *ex tempore* масою ( $75 \pm 5$ ) мг.

Токсичний вплив кріопротекторів визначали у середовищах із додаванням: ДМСО («ПанЕко») у кінцевих концентраціях 0,6; 1,2; 1,8 та 2,4 М; гліцерину («Dow Chemical», Німеччина) у кінцевих концентраціях 0,7; 1,4; 2,1 та 2,8 М; ПЕО-400 у кінцевих концентраціях 50, 100, 150 та 200 г/л; сахарози («ПанЕко») у кінцевих концентраціях 0,1; 0,5; 1,0 та 1,5 М. Термін експозиції звитих каналців сім'яників щурів у криозахисних середовищах складав 30 хв за температури 4°C [17].

Базуючись на результатах підбору найменш токсичних концентрацій досліджуваних кріопротекторів, визначали вплив часу експозиції на морфофункціональні показники звитих каналців сім'яників щурів. Використовували кріопротектори у наступних кінцевих концентраціях: середовище 1 – 0,6 М ДМСО; середовище 2 – 0,7 М гліцерину; середовище 3 – 50 г/л ПЕО-400; середовище 4 – 0,1 М сахарози. Контролем було середовище без додавання кріопротекторів. Експозиція звитих каналців сім'яників щурів складала 15, 30, 45 і 60 хв (4°C).

Криозахисні середовища виготовляли *ex tempore* на основі розчину Хенкса з додаванням 50 г/л бичачого сироваткового альбуміну (БСА) та відповідної концентрації кріопротектора. Після експозиції в усіх середовищах видаляли кріопротектори зі зразків шляхом трьохетапної зміни середовища кріоконсервування на розчин Хенкса.

Показник життєздатності клітин визначали після гомогенізації зразків за методом суправітального забарвлення трипановим синім [4].

Для гістологічних досліджень виготовляли парафінові зрізи звитих каналців товщиною 7 мкм, які фарбували гематоксиліном і еозином. Мікроскопію препаратів здійснювали з використанням мікроскопа «Carl Zeiss Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Німеччина). У подальшому ці зображення використо-

Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

The work was performed in 50 outbred white, sexually immature male rats of ( $50 \pm 15$ ) g weight and aged 7–8 weeks. Convulated tubules were obtained mechanically from both testes of rats and placed into a Hanks solution (PanEco, Russia). The *ex tempore* suspensions of ( $75 \pm 5$ ) mg of convulated seminiferous tubules cells were used in the studies.

Toxic effect of cryoprotectants was assessed in the media containing DMSO (PanEco) at final concentrations of 0.6; 1.2; 1.8 and 2.4 M; glycerol (Dow Chemical, Germany) at final concentrations of 0.7; 1.4; 2.1 and 2.8 M; polyethylene oxide with molecular weight of 400 (PEO-400) at final concentrations of 50, 100, 150 and 200 g/L; sucrose (PanEco) at final concentrations of 0.1; 0.5; 1.0 and 1.5 M. The exposure time of convulated tubule tissues of rats in cryoprotective media was 30 min at a temperature of 4°C [13].

Proceeding from the selection of the least toxic concentrations for the investigated cryoprotectants, the effect of exposure time on the morphofunctional characteristics of the testicular convulated tubule tissues of rats was determined. For this aim the cryoprotectants were used at the following final concentrations: medium 1 – 0.6 M DMSO; medium 2 – 0.7 M glycerol; medium 3 – 50 g/L PEO-400; medium 4 – 0.1 M sucrose. The control was the medium without the cryoprotectants added. Exposure of testicular convulated tubules of rats was 15, 30, 45 and 60 min at a temperature of 4°C.

Cryoprotective media were prepared *ex tempore* using Hanks solution supplemented with 50 g/L BSA as the base and the corresponding cryoprotectant concentration. After exposure to all the media, the cryoprotectants were removed from the samples by three-step change of cryopreservation medium to Hanks solution.

The cell viability was examined by means of supravital staining using Trypan blue after homogenizing the samples [18].

For histological studies, the paraffin sections were made of convulated tubules of 7  $\mu$ m thickness, which were stained with hematoxylin and eosin. Microscopy of the preparations was performed using a microscope Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Germany). Subsequently, these images were used to evaluate the histological structure of convulated tubule tissues of rat testes using the Axiovision v. 4.8 (Carl Zeiss), in particular, the average density of spermatogenic epithelium cells was determined with the method of G.G. Avtandilov [2] by counting the number of nuclei per unit of the section area with the subsequent recalculation to 1 mm<sup>2</sup>.

Metabolic activity of the samples of rat testes convulated tubules was assessed by total activity of lactate



ували для оцінки гістологічної структури звитих каналців сім'яників щурів за допомогою програмного забезпечення «Axiovision v. 4.8» («Carl Zeiss»), зокрема визначали середню щільність клітин сперматогенного епітелію за методом Г.Г. Автанділова [1] шляхом підрахунку кількості ядер на одиниці площі зрізу з наступним перерахунком на 1 мм<sup>2</sup>.

Метаболічну активність зразків звитих каналців сім'яників щурів оцінювали за загальною активністю лактатдегідрогенази (ЛДГ) та за допомогою МТТ-тесту («Fluka», Німеччина). Активність ЛДГ у зразках звитих каналців сім'яників щурів на зазначених термінах експозиції у середовищах кріоконсервування вимірювали за допомогою тест-наборів реактивів («Філіст-Діагностика», Україна) з використанням методу запуску реакції зразком. Для проведення тесту зразки готували зі шматочків тканин, які гомогенізували, фільтрували, центрифугували (1 000 g протягом 10 хв) та відбирали супернатант. До 20 мкл супернатанта додавали 1 мл монореактиву, перемішували та через 1 хв зчитували змінення екстинції з інтервалом 1 хв протягом 3 хв по відношенню до дистильованої води при довжині хвилі 365 нм на фотоелектрокалориметрі «КФК-2» (ЗОМЗ, Росія).

Відомо, що принцип МТТ-тесту заснований на здатності дегідрогеназ живих клітин відновлювати 3-(-4,5-диметилтіазоліл-2)-2,5-дифенілтетразолій бромистий у блакитні кристали формазау, які нерозчиняються у воді [22]. Для проведення МТТ-тесту кожен зразок переносили в 1 мл середовища Хенкса, до якого вносили по 0,5 мл розчину МТТ (5 мг/мл). Через 3 години інкубації (5% CO<sub>2</sub>, 37°C) утворений формазан розчиняли шляхом ресуспендування зразка у ДМСО до повного його знебарвлення. Від осаду, який утворився в результаті преципітації білків у ДМСО, звільнялися шляхом 10-хвилинного центрифугування при 1 000 g. Оптичну щільність розчину формазау в супернатанті вимірювали на фотоелектрокалориметрі «КФК-2» при довжині хвилі 540 нм проти холостої проби – культурального середовища без клітин.

Аналіз даних проводили з використанням пакетів програм «Excel» («Microsoft», США) та «Statistika 8» («StatSoft», США). Для визначення статистичної значущості відмінностей безперервних величин при міжгруповому порівнянні залежно від параметрів розподілу застосовували t-критерій Стьюдента або U-критерій Манна-Уїтні, при множинних (більше двох) порівняннях – методи one-way ANOVA або Kruskal-Wallis ANOVA.

### Результати та обговорення

На першому етапі роботи було проведено підбір найменш токсичних концентрацій досліджуваних кріопротекторів для звитих каналців сім'яників

dehydrogenase (LDH) and by MTT test (Fluka, Germany). LDH activity in the samples of the rat testes convoluted tubules in these terms of exposure to cryopreservation media was measured using test kits reagents (Felicita Diagnostika, Ukraine) by means of reaction triggering by the sample. For the test we prepared the samples from pieces of tissue which were homogenized, filtered, centrifuged (1,000 g for 10 min) and then the supernatant was studied. One milliliter of monoreagent was added to 20 ml supernatant and stirred, one minute later the extinction change was recorded at 1 min intervals for 3 min with respect to distilled water at 365 nm wavelength with photoelectrocalorimeter KFK-2 (ZOMZ, Russia).

It is known that the MTT test is based on the ability of dehydrogenases in living cells to restore 3-(-4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide to blue crystals of formazan, which are insoluble in water [20]. For the MTT test, each sample was transferred to 1 ml Hanks medium, to which 0.5 ml of MTT solution (5 mg/ml) was added. After 3 hrs of incubation (5% CO<sub>2</sub>, 37°C), the formed formazan was dissolved by re-suspending the sample in DMSO until it was completely discolored. The sediment, which was formed as a result of precipitation of proteins in DMSO, was disposed by 10-minute centrifugation at 1,000 g. The optical density of formazan solution in supernatant was measured with a photoelectrocalorimeter KFK-2 at 540 nm wavelength against a blank sample *i. e.* culture medium without cells.

Data were analyzed using Excel (Microsoft, USA) and Statistics 8 (StatSoft, USA) software. To determine the statistical significance of the differences in continuous variables when comparing between the groups, depending on the distribution parameters, the t-criterion of the Student or the Mann-Whitney U-criterion were used, with multiple (more than two) comparisons one-way ANOVA or Kruskal-Wallis ANOVA tests.

### Results and discussion

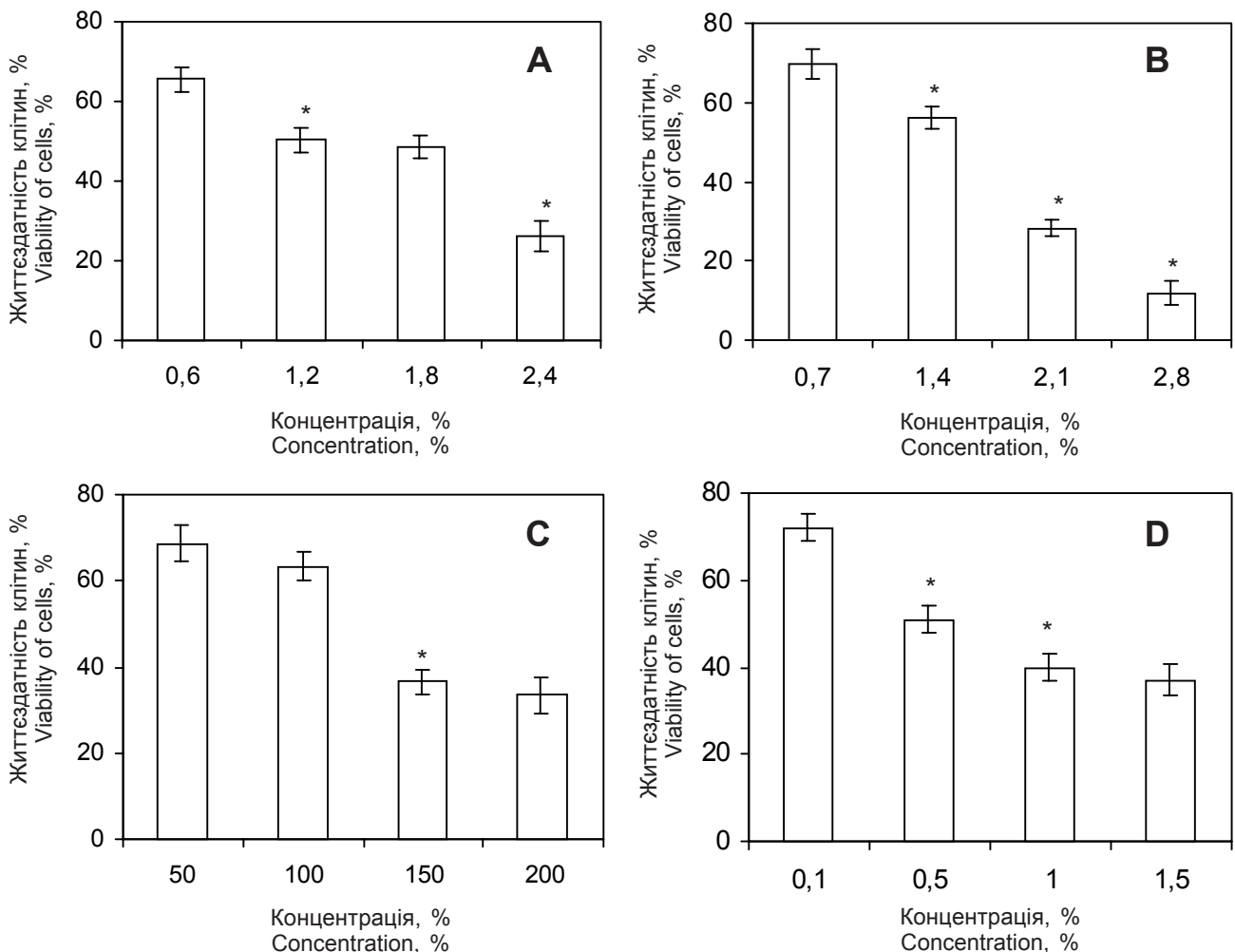
At the first stage of the research the least toxic concentrations of the investigated cryoprotectants for the convoluted tubule of the testes of immature rats were selected. It has been established, that at the 30-min exposure, the best viability of cells in the Trypan blue exclusion test was found using 0.7 M glycerol and 50 g/L PEO-400 (Fig. 1). At the same time, the decrease in viability for the control was 13.2% and 14.0%, respectively. In the case of using 0.6 M DMSO, the cell viability of convoluted tubules of testes in rats was 18.4% compared to the control. With an increase in the concentration of cryoprotectants, the percentage of viable cells after a 30-min exposure was likely to decline in all the cases.



статевонезрілих щурів. Встановлено, що після 30-хвилинної експозиції найкращі показники життєздатності клітин за тестом виключення трипанового синього були при використанні 0,7 М гліцерину і 50 г/л ПЕО-400 (рис. 1). При цьому зниження показника життєздатності щодо контролю складало 13,2 і 14,0% відповідно. У разі застосування 0,6 М ДМСО зниження показника життєздатності клітин звитих каналців сім'яників щурів складало 18,4% порівняно з контролем. Зі збільшенням концентрації кріопротекторів відсоток життєздатних клітин після 30-хвилинної експозиції вірогідно знижувався в усіх випадках.

Цитотоксичний вплив властивий як ендоцелюлярним, так і екзоцелюлярним кріопротекторам, а його ступінь залежить від типу, концентрації, часу та температури експозиції, а також від характеристик самого біооб'єкта. З літературних

Cytotoxic effect is inherent to both endocellular and exocellular cryoprotectants, and its degree depends on the type, concentration, exposure time and temperature, as well as the features of biological objects. From the published reports it is known that DMSO toxicity is associated with protein denaturation and destabilization of phospholipid bilayer [9, 12, 14], as well as with the possible caspase activation and apoptosis [1, 4, 30]. Toxic effects of glycerol depends on equilibration period and is manifested in a change of permeability of cell membranes, concentration of osmiophilic granules in nucleus, pinocytosis, appearance of cisterns and vacuoles in cytoplasm, damage of mitochondria and endoplasmic reticulum dehydration [7, 19]. Polyethylene oxide due to the presence of low fractions partially penetrates into the cells and the remains are adsorbed on the cell membrane, leading to a cell dehydration [24]. Like other non-penetrating protective agents,



**Рис. 1.** Життєздатність клітин сім'яників щурів після 30-хвилинної експозиції у середовищах із додаванням кріопротекторів: **A** – ДМСО; **B** – гліцерину; **C** – ПЕО-400; **D** – сахарози; \* – різниця статистично значуща відносно попередньої концентрації ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

**Fig. 1.** Viability of rat testes cells after the 30-min exposure in cryoprotective media supplemented with: **A** – DMSO; **B** – glycerol; **C** – PEO-400; **D** – sucrose; \* – the difference is statistically significant if compared with the previous concentration ( $p < 0.05$ ;  $n = 5$ ).

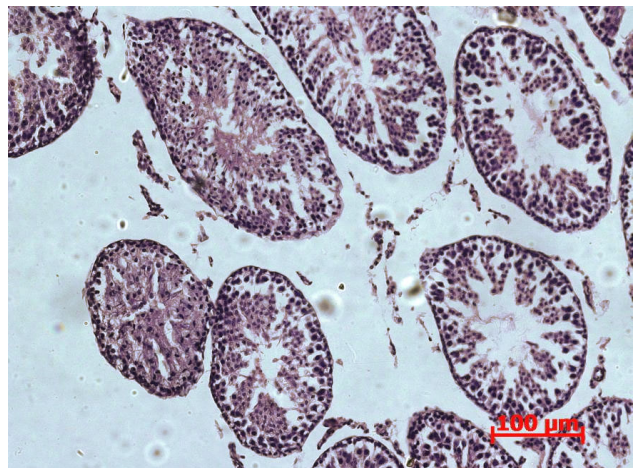


джерел відомо, що токсичність ДМСО пов'язана з денатурацією білків і дестабілізацією фосфоліпідного бішару [13, 16, 18], а також із можливістю активації каспаз та індукції апоптозу [7, 9, 30]. Токсична дія гліцерину залежить від еквілібраційного періоду та проявляється в зміні проникності мембран клітин, концентрації осміофільних гранул у ядрі, піноцитозі, появі цистерн та вакуолей у цитоплазмі, ушкодженні мітохондрій та зневодненні ендоплазматичного ретикулулу [11, 21]. Поліетиленоксид завдяки наявності низькомолекулярних фракцій частково проникає у клітини, а залишок адсорбується на клітинній мембрані, що призводить до дегідратації клітин [5]. Сахароза, як і інші непроникаючі протектори, у високих концентраціях створює гіпертонічне середовище, що спричиняє клітинну дегідратацію [24].

Гістологічне дослідження показало, що власна оболонка кожного канальця була представлена шаром міоїдних клітин і волокнами сполучної тканини. Всередині власної оболонки, відокремленої базальною мембраною, розташовувався сперматогенний епітелій. На кожній ділянці звитого канальця уздовж базальної мембрани знаходилися округлі клітини з гіперхромним ядром і тонким обідком цитоплазми – сперматогонії, над якими розташовувалися кілька рядів сперматоцитів – клітин із великим ядром і широким обідком цитоплазми (рис. 2).

Після експозиції в середовищі 1 (рис. 3) звиті канальця сім'яників щурів розташовувалися вільно, з нерівномірним розподілом ділянок інтерстицію між ними. На всіх термінах спостереження в складі сперматогенного шару визначалися клітини з гіперхромним ядром і різко еозинофільною цитоплазмою, що може бути пов'язано з розвитком у них некротичних змін. Крім того, вже через 15 хв експозиції у середовищі 1 зрідка виявлялися невеликі безклітинні ділянки сперматогенного епітелію (рис. 3, А), частота і розповсюдженість яких збільшувалися з подовженням часу експозиції (рис. 3, В–D). Місцями спостерігалася десквамація сперматогенного епітелію у просвіт канальців.

Після експозиції у середовищі 2 (рис. 4) звиті сім'яні канальця нещільно прилягали один до одного, мали округлу форму та нечіткі контури. Ділянки інтерстицію між канальцями практично були відсутні та розташовувалися вільно і нерівномірно. Сперматогенний епітелій зберігав зв'язок із базальною мембраною, проте товщина епітеліального шару була нерівномірною, а його межа – нечіткою. Через 15 хв експозиції статеві клітини втрачали організацію всередині сперматогенного шару та відшаровувалися в просвіт канальця (рис. 4, А). На 45-й хвилині спостереження в більшій частині звитих сім'яних канальців спостерігали осередки некрозу сперматоцитів (рис. 4, С).



**Рис. 2.** Звити канальця сім'яників статевонезрілих щурів після 30-хвилинної експозиції у розчині Хенкса з додаванням 50 г/л бичачого сироваткового альбуміну. Забарвлення гематоксилином та еозином.

**Fig. 2.** Convoluted tubules of testes in immature rats after 30-min exposure in Hanks solution supplemented with 50 g/L of bovine serum albumin. Hematoxylin and eosin staining.

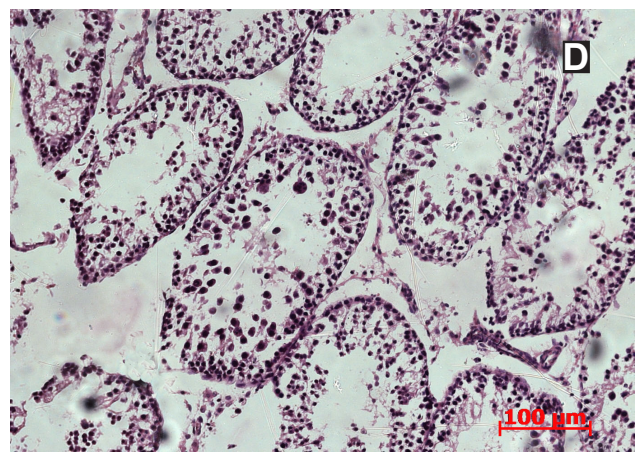
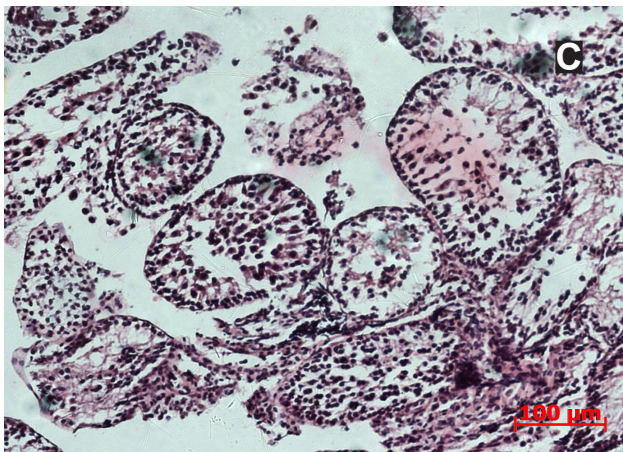
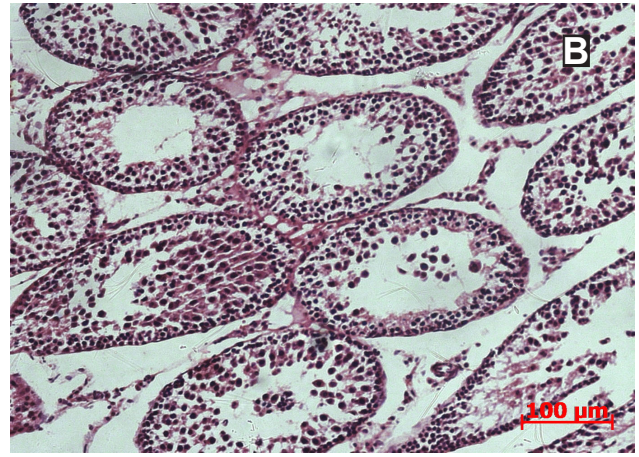
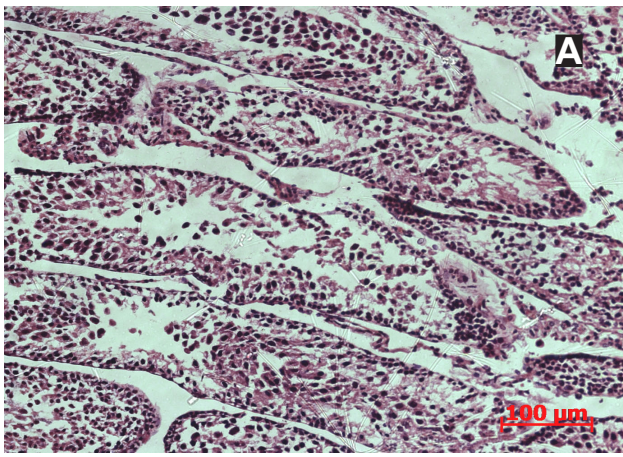
sucrose in high concentrations creates a hypertonic medium, causing a cell dehydration [22].

Histological study showed that the own membrane of each tubule was represented by a layer of myoid cells and connective tissue fibers. Inside of its own membrane, separated by a basal one, there is a spermatogenic epithelium. On each section of convoluted tubule along a basal membrane, the rounded cells with a hyperchromic nucleus and a thin rim of cytoplasm, *i. e.* spermatogonia, over which there were several rows of spermatocytes, the cells with a large nucleus and a wide rim of cytoplasm (Fig. 2) were observed.

After exposure to medium 1 (Fig. 3) the convoluted tubules of rat testes were freely located with uneven distribution of interstitium sites between them. At all the observation terms in the composition of spermatogenic layer there were found the cells with hyperchromic nucleus and well-marked eosinophilic cytoplasm, that may be associated with the development of necrotic changes in them. In addition, after 15 min exposure in medium 1 there were occasionally observed small areas of acellular spermatogenic epithelium (Fig. 3A), the incidence and prevalence of those were increased with a rise in exposure time (Fig. 3B–D). Somewhere the desquamation of spermatogenic epithelium in a lumen of the tubules was observed.

After exposure to medium 2 (Fig. 4), convoluted seminiferous tubules cells were loosely adjoining each other, and had a rounded shape and dim contours. The sites of interstitium between the tubules were very seldom and located freely and unevenly. The spermatogonial epithelium was not exfoliated from the basal





**Рис. 3.** Звиті сім'яні канальця статевонезрілих щурів після експозиції у середовищі 1 (0,6М ДМСО): **A** – 15 хв; **B** – 30 хв; **C** – 45 хв; **D** – 60 хв. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

**Fig. 3.** Convoluted tubules of testes in immature rats after exposure in the medium 1 (0.6 M of DMSO): **A** – 15 min; **B** – 30 min; **C** – 45 min; **D** – 60 min. Hematoxylin and eosin staining.

У разі використання середовища 3 (рис. 5) звиті сім'яні канальця мали чіткі округлі контури. Більшість клітин сперматогенного епітелію на ранніх термінах спостереження зберігали зональність та зв'язок із базальною мембраною. На 30-й хвилині спостереження місцями виявлялися невеликі осередки некрозу з явищами десквамації сперматогенного епітелію (рис. 5, A). Подовження часу експозиції до 45 хв призводило до появи окремих канальців із тотальним некрозом (рис. 5, B).

Після 15-хвилинної експозиції у середовищі 4 (рис. 6, A) виявлено хаотичне розташування статевих клітин усередині сперматогенного шару на тлі розволокнення та дезорганізації базальної мембрани. Описані зміни підтверджують розвиток некрозу статевого епітелію. Межа між шарами в сперматогенному епітелію була нечіткою. Зі збільшенням часу експозиції поступово зменшувалася загальна кількість клітин (рис. 6, B, C). На більш пізніх термінах спостереження виявлялися канальця з практично тотальним некрозом сперматогенного епітелію (рис. 6, D).

membrane, but the thickness of the epithelial layer was uneven and its fringe was vague. After 15 minutes of exposure, the cells lost their organization within the spermatogenic layer and disintegrated into the lumen of the tubule (Fig. 4A). At minute 45 of observation in the majority of the convoluted spermatogenic tubules the foci of necrosis of spermatocytes were observed (Fig. 4C).

When medium 3 was used (Fig. 5), the seminiferous tubules had clear rounded contours. Most cells of spermatogenic epithelium in the earliest terms of observation retained zonation and contact with the basal membrane. At the minute 30 of observation, small areas of necrosis with desquamation of spermatogenic epithelium appeared (Fig. 5A). Prolongation of the exposure time up to 45 min resulted in the appearance of individual tubules with total necrosis (Fig. 5B).

After a 15-minute exposure to medium 4 (Fig. 6A), the chaotic location of the germ cells inside the spermatogenic layer was observed on the background of fusion and disorganization of the basal membrane. The described changes evidenced the development of necrosis

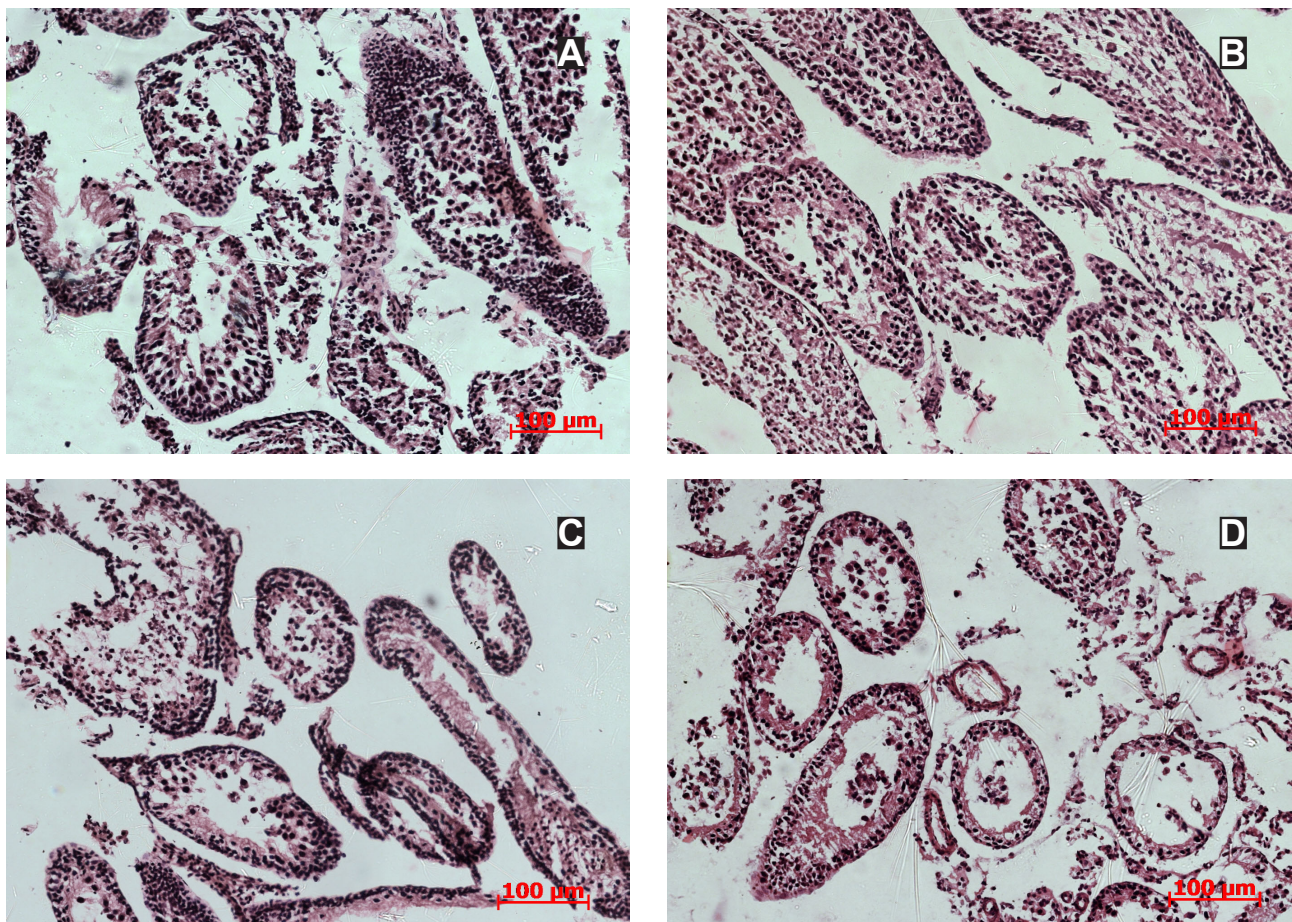




Щільність розташування клітин сперматогенного епітелію була більш чутливою до експозиції у досліджуваних кріозахисних середовищах. Так, у всіх середовищах, окрім середовища 3, зі збільшенням часу експозиції щільність розташування клітин сперматогенного епітелію значуще зменшувалася (рис. 7) та залежала від складу кріозахисного середовища. Найбільш низькі показники на кінець експозиції (60 хв) були отримані в разі застосування ДМСО, при цьому щільність розташування клітин сперматогенного епітелію значуще знижувалася (у 2 рази) порівняно з показником на початку експерименту. Найменш токсичний вплив на клітини сперматогенного епітелію згідно з цим показником мало середовище з додаванням ПЕО-400, при цьому досліджуваний показник не змінювався. Під час 30-хвилинної експозиції звитих каналців у середовищі 2 значущого зменшення щільності клітин сперматогенного епітелію не було, а після 60-хвилинної експозиції цей показник становив 29,5% відносно 15-ї хвилини спостереження.

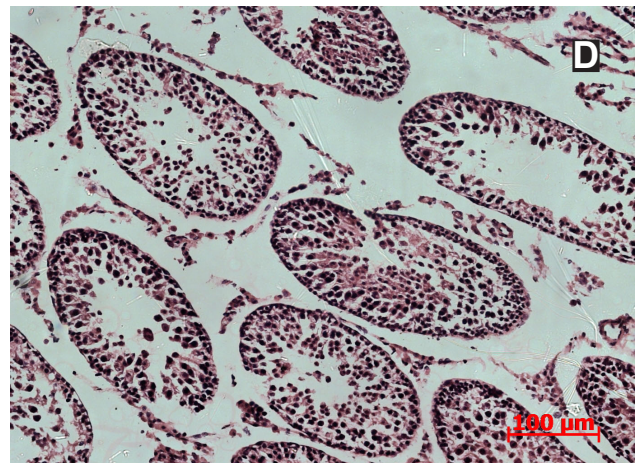
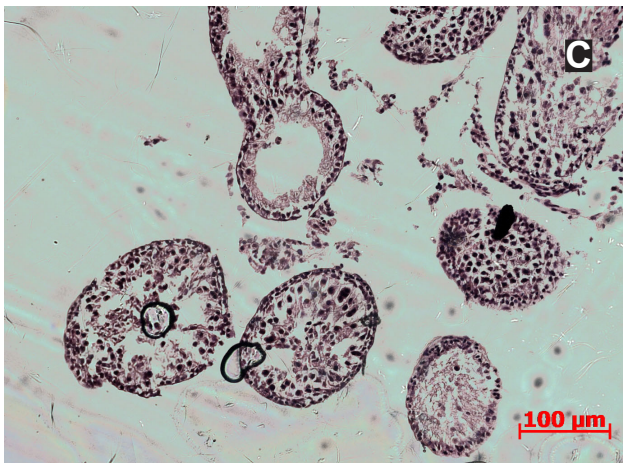
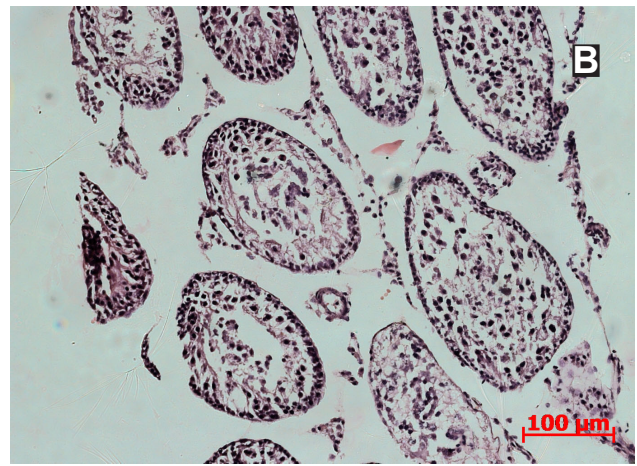
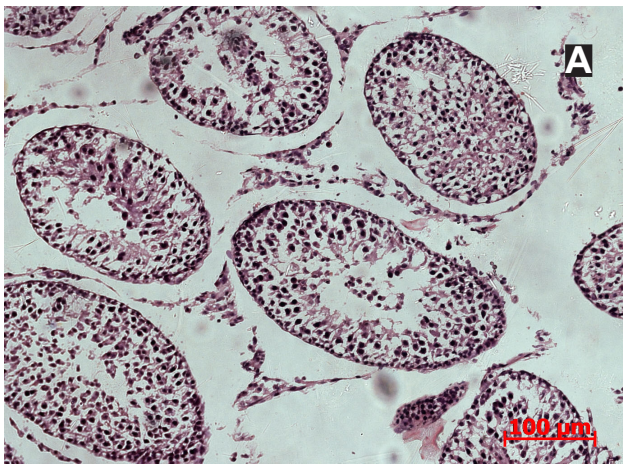
of the epithelium. The boundary between layers in the spermatogenic epithelium was unclear. As the exposure time increased, the total number of cells gradually decreased (Fig. 6B,C). At later stages of the observation the tubules with almost total necrosis of the spermatogenic epithelium appeared (Fig. 6D)

The density of spermatogenic epithelium cells arrangement was more sensitive to exposure in the cryopreservation media under study. Thus, in all the media except medium 3, with increasing an exposure time the density of spermatogenic epithelium cells significantly decreased (Fig. 7), also the extent of reduction depended on the composition of cryoprotective medium. The lowest values at the end of the exposure (60 min) were obtained with DMSO, the density of spermatogenic epithelium cells was significantly reduced (two times) compared with the values at the beginning of the experiment. The least toxic effects on the cells of spermatogenic epithelium according to this index was the medium supplemented with PEO-400, with an average index of spermatogenic epithelium cell density was not significantly reduced. During the 30-min



**Рис. 4.** Звиті сім'яні каналця статевонезрілих щурів після експозиції у середовищі 2 (0,7 М гліцерин): **A** – 15 хв; **B** – 30 хв; **C** – 45 хв; **D** – 60 хв. Забарвлення гематоксилином та еозином.

**Fig. 4.** Convoluted tubules of testes in immature rats after exposure in the medium 2 (0.7 M of glycerol): **A** – 15 min; **B** – 30 min; **C** – 45 min; **D** – 60 min. Hematoxylin and eosin staining.



**Рис. 5.** Звиті сім'яні каналця статевонезрілих щурів після експозиції у середовищі 3 (50 г/л ПЕО-400): **А** – 15 хв; **В** – 30 хв; **С** – 45 хв; **Д** – 60 хв. Забарвлення гематоксилином та еозином.

**Fig. 5.** Convuluted tubules of testes in immature rats after exposure in the medium 3 (50 g/L of PEO-400): **A** – 15 min; **B** – 30 min; **C** – 45 min; **D** – 60 min. Hematoxylin and eosin staining.

Результати дослідження впливу криозахисних середовищ на активність ЛДГ наведено на рис. 8. Експозиція протягом 15 або 30 хв у всіх застосованих криозахисних середовищах не призводила до значущих змін показника активності ЛДГ у порівнянні з контролем (середовище Хенкса + 50 г/л БСА). При експозиції протягом 45 хв спостерігали тенденцію до зниження дослідженого показника в усіх середовищах, а саме: у 1 та 2 – на 47,2 та 48,1% відповідно; 3 – на 24,3%; 4 – на 30,2% у порівнянні з попереднім строком (30 хв). Після 60-хвилинної експозиції тканин в усіх середовищах спостерігали зниження активності ЛДГ більше ніж у 2 рази у порівнянні з відповідними показниками на 15-й хвилині. Таким чином, подовження часу експозиції тканин більше 30 хв призводило до суттєвих змін активності ЛДГ, що, ймовірно, свідчить про пригнічення метаболічних процесів у клітинах.

За результатами МТТ-тесту (рис. 9) встановлено, що 15-хвилинна експозиція у криозахисних сере-

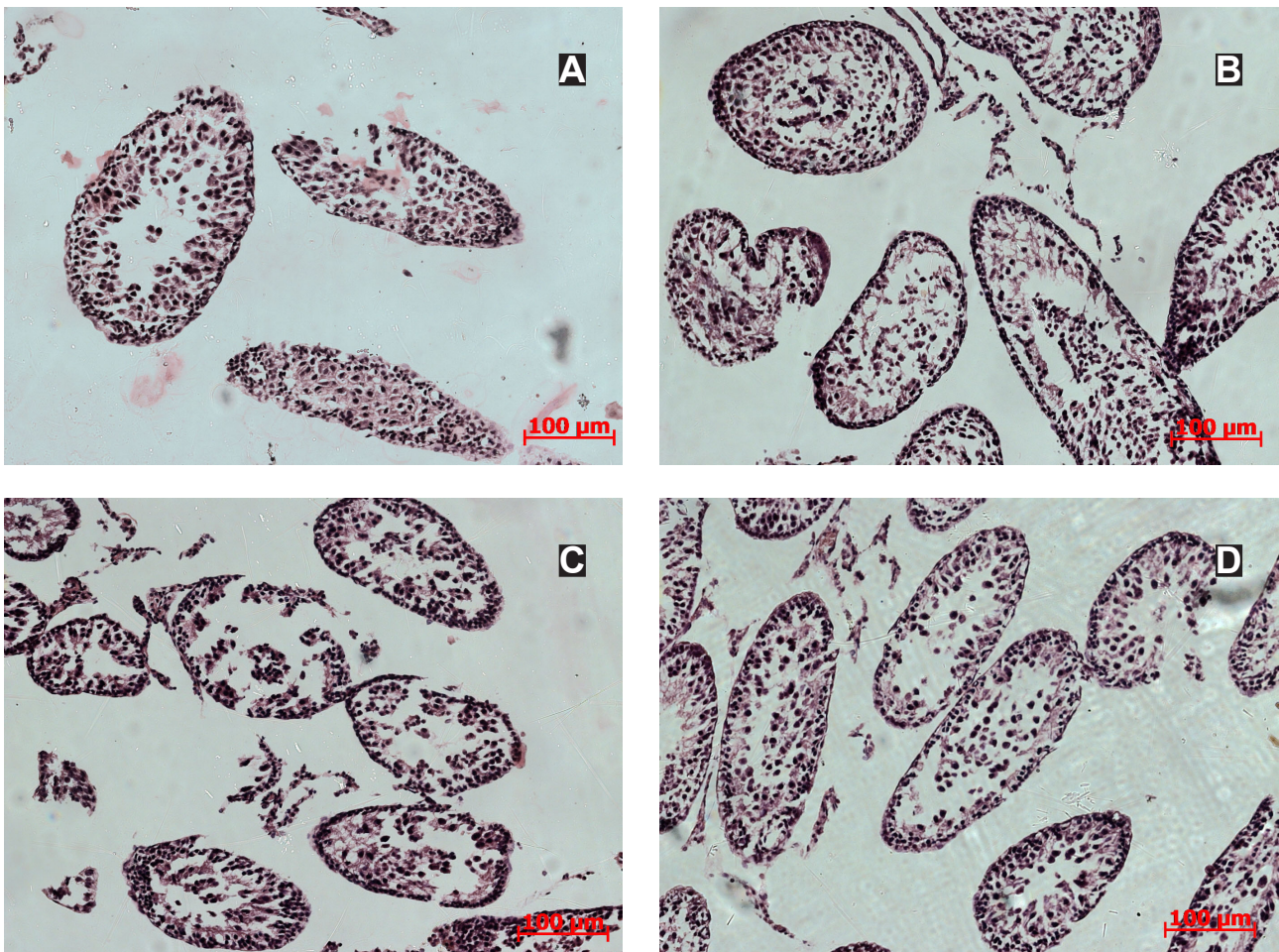
додку convoluted tubules in medium 2 no significant reduction of spermatogenic epithelium cell density was found, and after 60-min exposure this index made only 29.5% to minute 15 of observation.

The results of the study of the influence of cryoprotective media on the LDH activity are shown in Fig. 8. Exposure either for 15 or 30 min in all cryopreservation media tested did not lead to strong changes in LDH activity if compared to the control (Hanks + 50 g/L BSA) as well as between the investigated media. During exposure for 45 min there was a tendency to a decrease in the investigated index in all the media, namely: 1 and 2 – by 47.2 and 48.1% respectively; 3 – by 24.3%; 4 – by 30.2% compared to the previous exposure period (30 min). At 60-min exposure of tissues in all investigated media, we observed lowering of index by more than 2 times if compared to the corresponding values at minute 15. Thus, an increase in the tissue exposure time of more than 30 minutes resulted in significant changes in LDH activity, which probably indicated the damage to metabolic processes in the cells.



довищах не призводила до значущих змін показника метаболічної активності у порівнянні з контролем та кріозахисними середовищами. Під час експозиції протягом 30 хв спостерігали тенденцію до зниження дослідженого показника в усіх розглянутих випадках у порівнянні з попереднім строком (15 хв), а саме: контроль (середовище Хенкса + 50 г/л БСА) – на 11,2%, середовище 1 – на 12,4%; середовище 2 – на 10,2%; середовище 3 – на 15,1%; середовище 4 – на 13,5%. Після 45-хвилинної експозиції тканин метаболічна активність в усіх розглянутих випадках була зниженою порівняно з попереднім строком спостереження (30 хв), а саме: контроль – на 13,1%; середовище 1 – на 14,2%; середовище 2 – на 14,8%; середовище 3 – на 15,6%; середовище 4 – на 13,1%. Збільшення часу експозиції тканин до 60 хв не призводило до змін досліджуваного показника у порівнянні з попереднім строком спостереження (45 хв). Отже, експозиція тканин понад 30 хв призводила до зниження метаболічної активності клітин в усіх середовищах, зокрема в контролі.

The results of the MTT test (Fig. 9) indicate that the 15-min exposure in studied cryopreservation media did not lead to a significant change in metabolic activity if compared to the control and between the investigated cryoprotective agents. During the exposure for 30 min there was a tendency to a decrease in the investigated index for all considered cases if compared to 15-min exposure, namely: control (Hanks + 50 g/L BSA) – by 11.2%, medium 1 – 12.4%; medium 2 – 10.2%; medium 3 – by 15.1%; medium 4 – by 13.5%. At 45-min exposure of the tissue the investigated index in all considered cases was lower if compared to the previous observation term (30 min), namely: control – by 13.1%; medium 1 – by 14.2%; medium 2 – by 14.8%; medium 3 – by 15.6%; medium 4 – by 13.1%. An increase in the tissue exposure time of up to 60 minutes did not lead to changes in the investigated index compared with the previous observation period (45 min). Consequently, the tissue exposure of more than 30 min led to a decrease in the metabolic activity of cells in all investigated media, including the control.



**Рис. 6.** Звиті сім'яні каналця статевонезрілих щурів після експозиції у середовищі 4 (0,1 М сахароза): **A** – 15 хв; **B** – 30 хв; **C** – 45 хв; **D** – 60 хв. Забарвлювання гематоксилином та еозином.

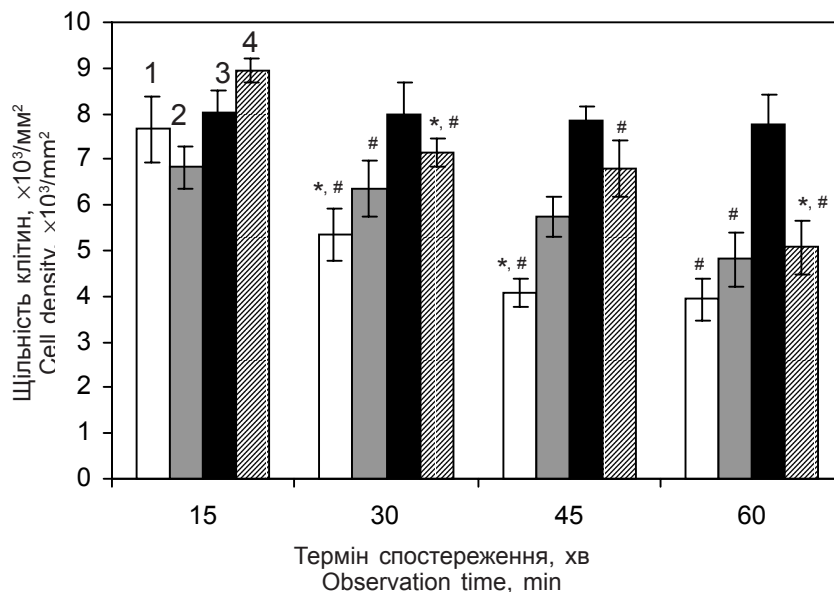
**Fig. 6.** Convoluted tubules of testes in immature rats after exposure in the medium 4 (0.1 M of sucrose): **A** – 15 min; **B** – 30 min; **C** – 45 min; **D** – 60 min. Hematoxylin and eosin staining.

Отримані нами дані за МТТ-тестом на 60-й хвилині узгоджуються з результатами вимірювання активності ЛДГ на тому ж строку, що свідчить про пригнічення метаболічних процесів у клітинах, обумовлених тривалістю експозиції.

У представлений роботі проведено порівняльну оцінку впливу експозиції у середовищах різного композиційного складу на морфологічні параметри та метаболічну активність клітин звитих канальців сім'яників статевозрілих щурів. Встановлено, що 30-хвилинна експозиція зразків тканин у середовищах на основі розчину Хенкса та 50 г/л бичачого сироваткового альбуміну з додаванням 0,6 М ДМСО або 0,7 М гліцерину не викликала ушкоджень сперматогенного епітелію та зниження метаболічної активності клітин (МТТ-тест та активність ЛДГ). Раніше було показано, що криоконсервування фрагментів тканин яєчка у порівнянні зі суспензією клітин призводить до збереження більшого відсотку сперматогенних стовбурових клітин у загальній популяції [20, 23, 27]. Цей ефект пов'язаний із негативним впливом протеолітичних ферментів при ферментативній обробці тестикулярної тканини, мінімізацією простору навколо гермінативних клітин завдяки їх асоціації між собою, клітинами Сертолі, базальною мембраною та перитубулярними міоїдними клітинами, а також із наявністю колагену IV типу в базальній мембрані канальців, що також може виконувати додаткову криопротекторну функцію.

Як відомо, процес низькотемпературного консервування біоб'єктів складається з кількох етапів: виділення, експозиція у криозахисному середовищі, заморожування, зберігання при низьких температурах та розморожування. На усіх етапах біологічний об'єкт піддається впливу пошкоджуючих факторів. На дослідженому в нашій роботі одному з перших етапів криоконсервування – експозиції тканини з криозахисними середовищами – найбільш вагомими параметрами, які можуть спричинити пошкоджуючу дію, є тривалість обробки, температура, тип та концентрація криопротектора.

У нашій роботі було досліджено вплив різних кінцевих концентрацій ДМСО, гліцерину, ПЕО-400 і сахарози, а також часу експозиції у криозахисних



**Рис. 7.** Середня щільність розташування клітин сперматогенного епітелію після експозиції у криозахисних середовищах у динаміці: 1 – □, 2 – ■, 3 – ■, 4 – ▨; \* – різниця статистично значуща до попереднього терміну спостереження; # – різниця статистично значуща відносно 15-хвилинної експозиції у відповідному криозахисному середовищі ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

**Fig. 7.** Average density of location of spermatogenic epithelium cells after exposure in cryoprotective media in dynamics: 1 – □, 2 – ■, 3 – ■, 4 – ▨; \* – the difference is statistically significant in accordance with the previous observation period; # – the difference is statistically significant relative to 15-min exposure in applicable cryoprotective medium ( $p < 0.05$ ;  $n = 5$ ).

The data obtained by the MTT test for 60 min are consistent with the results of measurements of LDH activity at the same time of exposure, which indicates the inhibition of metabolic processes in cells due to the exposure duration.

In the present work the effect of exposure in media of different composition on morphological parameters and metabolic activity of the cells of convoluted tubules of immature rat testes was comparatively assessed. It was found that 30-min exposure of tissue samples to Hanks and 50 g/L bovine serum albumin with either 0.6 M dimethyl sulfoxide (DMSO) or 0.7 M glycerol did not impair the spermatogenic epithelium and decrease the metabolic activity of the cells (MTT test and LDH activity). Previously it was reported [17, 21, 27], that cryopreservation of testicular tissue fragments if compared with cell suspension resulted in preservation of a larger percentage of spermatogonial stem cells in total population. This effect was associated with negative effects of proteolytic enzymes during enzymatic treatment of testicular tissue, minimizing the space around the germinal cells due to their association between each other, Sertoli cells, basal membrane and peritubular myoid cells, as well as the presence of type IV collagen in basal membrane of tubules, which also may perform an additional cryoprotective function.

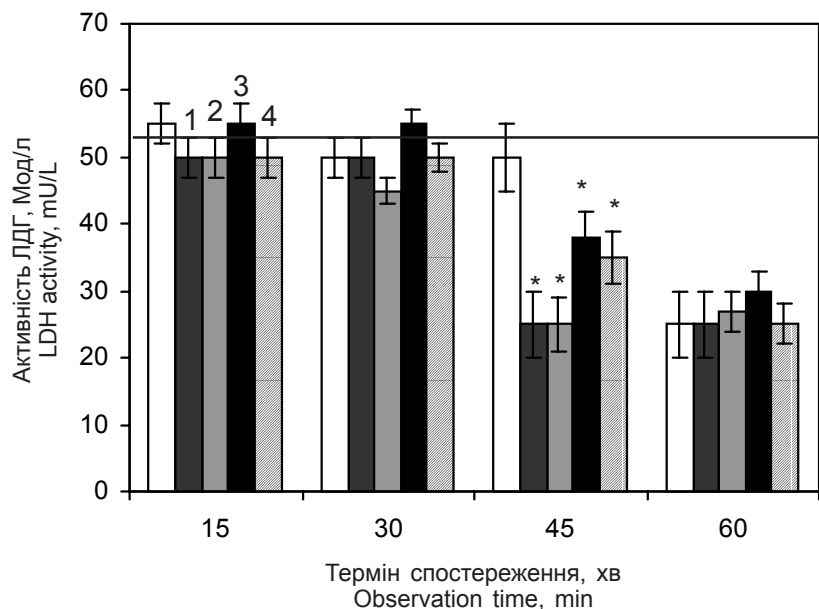


розчинах (на основі розчину Хенкса та 50 г/л БСА) на життєздатність клітин звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів та їх морфологічні параметри. За результатами дослідження оптимальними на етапі експозиції звитих сім'яних каналців статевонезрілих щурів можна вважати наступні концентрації кріопротекторів: ДМСО – 0,6 М; гліцерин – 0,7 М; ПЕО-400 – 50 г/л; сахароза – 0,1 М. При 30-хвилинній експозиції звитих каналців сім'яників щурів у середовищах із використанням зазначених концентрацій кріопротекторів показники життєздатності клітин за тестом виключення трипанового синього зберігалися на рівні 65–69% в усіх досліджених випадках. Збільшення кінцевої концентрації кріопротекторів негативно впливало на життєздатність клітин.

Дослідження тривалості експозиції у середовищах показало, що використання середовищ на основі розчину Хенкса та 50 г/л БСА з додаванням 0,6 М ДМСО або 0,7 М гліцерину не призводило до ушкоджень сперматогенного епітелію при тривалості експозиції не більше 30 хв. За даними гістологічних досліджень подовження часу експозиції викликало ушкодження тканин звитих каналців сім'яників, а саме: десквамацію, появу безклітинних ділянок та зменшення щільності клітин сперматогенного епітелію. Слід зазначити, що використання середовищ на основі розчину Хенкса та 50 г/л бичачого сироваткового альбуміну з додаванням 50 г/л ПЕО-400 або 0,1 М сахарози також негативно впливало на досліджені гістологічні параметри та зі збільшенням часу експозиції до 45 хв призводило до тотального некрозу сперматогенного епітелію. Не дивлячись на різний принцип дії досліджених кріопротекторів (ДМСО та гліцерин є ендоцелюлярними, а ПЕО-400 та сахароза – екзоцелюлярними), ми отримали однаковий негативний ефект на термінах експозиції, які перевищували 30 хв. Можна припустити, що такі результати пов'язані з різною швидкістю проникнення кріопротекторів у тканини. Так, відомо, що ДМСО насичує клітини підшлункової залози за 10–15 хв, а гліцерин – за 180 хв [26]. Було показано [3], що збільшення ступеня дегідратації та часу знаходження гепатоцитів у зневодненому стані підвищує ризик їх пошкодження в результаті осмотичного шоку. Зниження

Low-temperature preservation of biological objects is known to consist of several stages: selection, exposure in cryoprotective medium, freezing, storage at low temperatures and thawing. At all the stages biological object is exposed to harmful factors. In this research we considered one of the first stages of cryopreservation, *i. e.* exposure of tissue to cryoprotective media. The most crucial factors which are capable of damaging the tissue are as follows: treatment duration, temperature, type and concentration of cryoprotective agent.

We investigated the effect of different final concentrations of DMSO, glycerol, PEO-400 and sucrose and the time of exposure to cryoprotective solutions (based on Hanks solution and 50 g/L BSA) on viability of the cells of convoluted tubules of immature rats' testes and their morphological parameters. According to the findings the following concentrations of cryoprotectants can be considered as optimal at the exposure stage of convoluted seminiferous tubules of sexually immature rats: DMSO – 0.6 M; glycerol – 0.7 M; PEO-400 – 50 g/L; sucrose – 0.1 M. At 30-min exposure of the convoluted tubules of rat testes in the media using the indicated concentrations of cryoprotectants, the viability of cells in the trypan blue exclusion test was maintained at 65–69% for all the investigated options. An increase in the final concentration of cryoprotectants negatively affected cell viability.

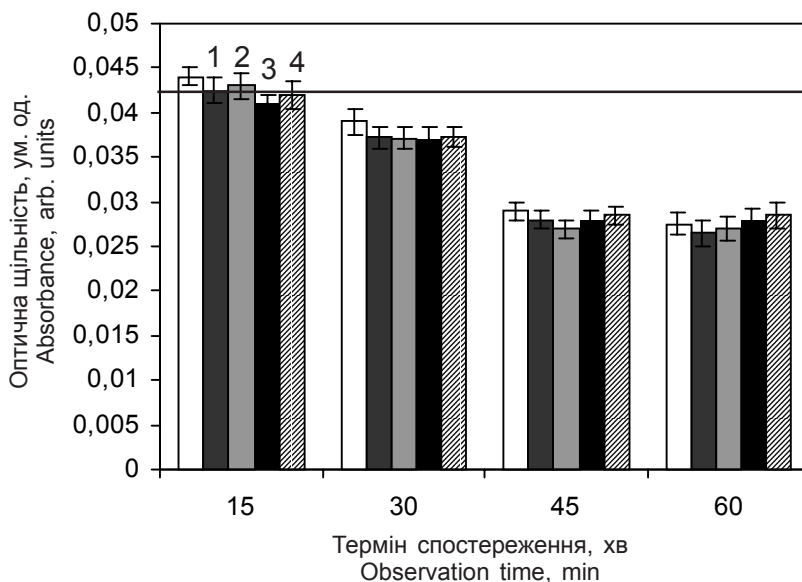


**Рис. 8.** Динаміка активності лактатдегідрогенази у клітинах звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів при експозиції у кріозахисних середовищах: контроль – □, 1 – ■, 2 – ■, 3 – ■, 4 – ▨. Суцільна лінія – показник інтактного контролю; \* – різниця значуща відносно відповідного контролю ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

**Fig. 8.** Dynamics of activity of lactate dehydrogenase in the cells of convoluted tubules of testes in immature rats under exposure in cryopreservation media: control – □, 1 – ■, 2 – ■, 3 – ■, 4 – ▨. Solid line shows the level of intact control; \* – the difference is significant relative to the corresponding control ( $p < 0.05$ ;  $n = 5$ ).

рівня життєздатності 8-клітинних ембріонів миші при подовженні часу еквілібрації у середовищі заморожування до 3 хв, на думку деяких авторів [6], обумовлено збільшенням тривалості перебування ембріонів у зневодненому стані під дією високих концентрацій компонентів середовища заморожування. Це призводить до порушень загальної інтегральної цілісності та взаємодій внутрішньоклітинних структур. Таким чином, швидкість насичення біооб'єкта криопротектором, а отже, і токсична дія останнього залежать не тільки від структурної організації самого об'єкта, але й від вихідних характеристик застосованого криопротектора

Виявлені під час гістоморфометричного дослідження зміни узгоджувалися із даними, отриманими під час вивчення метаболічної активності. Було показано, що збільшення часу експозиції тканин більше ніж 30 хв у всіх досліджуваних середовищах, у тому числі й у контрольних зразках, призводило до зниження метаболічної активності клітин за МТТ-тестом та активності ЛДГ. Це, ймовірно, свідчило про початок розвитку некротичних процесів у тканині, обумовлених тривалістю експозиції. Таким чином, результати представленої роботи можуть бути використані у наступних дослідженнях та під час розробки ефективних протоколів криоконсервування звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів.



**Рис. 9.** Метаболічна активність (оптична щільність розчину формазану в МТТ-тесті) клітин звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів при експозиції у криозахисних середовищах: контроль – □, 1 – ■, 2 – ■, 3 – ■, 4 – ▨. Суцільна лінія – показник інтактного контролю.

**Fig. 9.** Metabolic activity (absorbance of formazan solution in MTT-test) of convoluted tubules of testes in immature rats under exposure in cryoprotective media: control – □, 1 – ■, 2 – ■, 3 – ■, 4 – ▨. Solid line is an indicator of intact control.

Study of the exposure time in the investigated media showed that the use of media based on Hanks solution and 50 g/L BSA supplemented with either 0.6 M DMSO or 0.7 M glycerol did not cause damage to the spermatogenic epithelium with an exposure duration of not longer than 30 min. An increase in the exposure time resulted in injury to the tissues of the convoluted tubule of the testes according to histological studies, namely, desquamation, the appearance of cell-free areas, and reduced cell density of the spermatogenic epithelium. It should be noted that the use of the media based on Hanks solution and 50 g/L bovine serum albumin supplemented with 50 g/L PEO-400 or 0.1 M sucrose also negatively affected the histological parameters studied and with an increase in exposure time of up to 45 min led to an appearance of total necrosis of the spermatogenic epithelium. Despite the different principle of the action of the investigated cryoprotectants (endocellular DMSO and glycerol, and exocellular PEO-400 and sucrose), we obtained the same negative effect at exposure terms, which exceeded 30 min. It can be assumed that these results are related to different rates of penetration of cryoprotectants into a tissue. So, DMSO is known to saturate pancreatic cells for 10–15 minutes, and glycerol did for 180 min [25]. It was shown [16] that increasing the dehydration rate and the time of staying the hepatocytes in a dehydrated state enhanced the risk of their damage as a result of osmotic shock. Some authors [26] reported that the decrease in viability of 8-cell mouse

embryos with an increase in the equilibration time in a freezing medium of up to 3 min was due to a rise in duration of the embryos' staying in a dehydrated state under the influence of high concentrations of the components of the freezing medium, which led to disorders in integrity and interactions of intracellular structures. Thus, the rate of bioobject saturation by cryoprotectant, and, consequently, the toxic effect of the latter, depended not only on structural organization of the object itself, but also on initial characteristics of the applied cryoprotectant.

The observed histomorphometric changes were consistent with the data obtained during investigation of metabolic activity. It has been shown that an increase in tissue exposure time longer than 30 min in all the studied media, including the control samples, led to a decrease in metabolic activity of cells by MTT test and LDH activity, which probably indicated the beginning of the development of necrosis



## Висновки

Використання криозахисних середовищ на основі розчину Хенкса та 50 г/л бичачого сироваткового альбуміну з додаванням 0,6 М ДМСО або 0,7 М гліцерину не призводить до змін щільності клітин сперматогенного епітелію та їх метаболічної активності під час експозиції звитих канальців сім'яників щурів не більше ніж 30 хвилин.

Експозиція впродовж 45 та 60 хв тканин звитих канальців сім'яників статевонезрілих щурів у криозахисних середовищах із використанням розчину Хенкса та 50 г/л БСА з додаванням 0,6 М ДМСО, 0,7 М гліцерину, 50 г/л ПЕО-400 та 0,1 М сахарози призводила до явищ десквамації, появи ділянок некрозу, значущого зниження щільності клітин сперматогенного епітелію та їх метаболічної активності.

Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки ефективних методик криоконсервування звитих канальців сім'яників статевонезрілих щурів.

## Література

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: Руководство. – М.: Медицина, 1990. – 384 с.
2. Быстрова О.В., Калугина А.С., Цыбатова Е.В. и др. Способы восстановления фертильности у онкологических больных // *Практ. онкология*. – 2009. – Т. 10, №4. – С. 245–253.
3. Кулешова Л.Г., Гордиенко Е.А., Коваленко И.Ф. Проницаемость плазматических мембран гепатоцитов крысы для молекул воды в неизотонической среде электролитов // *Біофізичний вісник*. – 2002. – Т. 11, №2. – С. 39–42.
4. Методи клінічних та експериментальних досліджень в медицині / За ред. І.П. Кайдашева. – Полтава, 2003. – 320 с.
5. Пушкарь Н.С., Шраго М.И., Белоус А.М., Калугин Ю.В. Криопротекторы. – К.: Наук. думка, 1978. – 204 с.
6. Смольянинова Е.И., Хроменкова О.Б., Жерноклев Г.В., Пишко О.В. Влияние эквilibрации в среде замораживания на осмотическую устойчивость и жизнеспособность 8-клеточных эмбрионов мыши // *Проблемы криобиологии*. – 2004. – №1. – С. 3–11.
7. Aliakbari F., Yazdekhasti H., Abbasi M. et al. Advances in cryopreservation of spermatogonial stem cells and restoration of male fertility // *Microsc. Res. Tech.* – 2016. – Vol. 79, №2. – P. 122–129.
8. Baert Y., Braye A., Struijk R.B. et al. Cryopreservation of testicular tissue before long-term testicular cell culture does not alter in vitro cell // *Fertil. Steril.* – 2015. – Vol. 104, №5. – P. 1244–1252.
9. Baust J.M., Vogel M.J., Van Buskirk R., Baust J.G. A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival // *Cell Transplant.* – 2001. – Vol. 10, №7. – P. 561–571.
10. Day J.G., Stacey G.N. Cryopreservation and freeze-drying protocols. – Totowa, New Jersey: Humana Press, 2007. – 365 p.
11. Dooley D.C., Law P., Schork P., Meryman H.T. Glycerolization of the human neutrophil for cryopreservation: osmotic response of the cell // *Exp. Hematol.* – 1982. – Vol. 10. – P. 423e434.
12. Easley C., Simerly C., Schatten G. Stem cell therapeutic possibilities: future therapeutic options for male-factor and female-factor infertility? // *Reprod. Biomed. Online.* – 2013. – Vol. 27, №1. – P. 75–80.

processes in tissues due to the duration of the exposure. Thus, the results of the presented research could be taken as a basis for subsequent studies and during the development of effective cryopreservation protocols for convoluted tubule tissues of the sexually immature rats.

## Conclusions

Use of cryoprotective media solution based on Hanks and 50 g/L of bovine serum albumin supplemented with 0.6 M DMSO or 0.7 M glycerol did not result in the changes in spermatogenic epithelium cell density and their metabolic activity during exposure of convoluted tubules of rats for not longer than 30 min.

Exposure of the tissue of convoluted tubules of immature rat testes within 45 and 60 min to cryoprotective media based on Hanks solution and 50 g/L BSA supplemented with 0.6 M DMSO, 0.7 M glycerol, 50 g/L PEO-400 and 0.1 M sucrose led to desquamation, emergence of necrosis areas, significant reduction in spermatogenic epithelium cell density and their metabolic activity.

The data could be used to investigate and develop effective methods to cryopreserve the convoluted tubules of the immature rat testes.

## References

1. Aliakbari F., Yazdekhasti H., Abbasi M. et al. Advances in cryopreservation of spermatogonial stem cells and restoration of male fertility. *Microsc Res Tech* 2016; 79(2): 122–129.
2. Avtandilov G.G. Medical morphometry: Manual. Moscow: Meditsina; 1990.
3. Baert Y., Braye A., Struijk R.B. et al. Cryopreservation of testicular tissue before long-term testicular cell culture does not alter in vitro cell. *Fertil Steril* 2015; 104(5): 1244–1252.
4. Baust J.M., Vogel M.J., Van Buskirk R., Baust J.G. A molecular basis of cryopreservation failure and its modulation to improve cell survival. *Cell Transplant* 2001; 10(7): 561–571.
5. Bystrava O.V., Kalugina A.S., Tsybatova E.V. et al. Methods for recovering fertility in cancer patients. *Prakt Onkologiya* 2009; 10(4): 245–253.
6. Day J.G., Stacey G.N. Cryopreservation and freeze-drying protocols. – Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007.
7. Dooley D.C., Law P., Schork P., Meryman H.T. Glycerolization of the human neutrophil for cryopreservation: osmotic response of the cell. *Exp Hematol* 1982; 10: 423e434.
8. Easley C., Simerly C., Schatten G. Stem cell therapeutic possibilities: future therapeutic options for male-factor and female-factor infertility? *Reprod Biomed Online* 2013; 27(1): 75–80.
9. Fleming K.K., Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells. *Transfus Apher Sci* 2006; 34(3): 309–315.
10. Ginsburg E.S., Yanushpolsky E.H., Jackson K.V. In vitro fertilization for cancer patients and survivors. *Fertil Steril* 2001; 75(4): 705–710.
11. Izadyar F., Matthijs-Rijsenbilt J.J., den Ouden K. et al. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia. *J Androl* 2002; 23(4): 537–545.
12. Izadyar F., Spierenberg G.T., Creemers L.B. et al. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. *Reproduction* 2002; 124(1): 85–94.



13. Fleming K.K., Hubel A. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells // *Transfus. Apher. Sci.* – 2006. – Vol. 34, №3. – P. 309–315.
14. Ginsburg E.S., Yanushpolsky E.H., Jackson K.V. In vitro fertilization for cancer patients and survivors // *Fertil. Steril.* – 2001. – Vol. 75, №4. – P. 705–710.
15. Izadyar F., Matthijs-Rijsenbilt J.J., den Ouden K. et al. Development of a cryopreservation protocol for type A spermatogonia // *J. Androl.* – 2002. – Vol. 23, №4. – P. 537–545.
16. Izadyar F., Spierenberg G.T., Creemers L.B. et al. Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis // *Reproduction.* – 2002. – Vol. 124, №1. – P. 85–94.
17. Keros V., Hultenby K., Borgstrom B. et al. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment // *Hum. Reprod.* – 2007. – Vol. 22, №5. – P. 1384–1395.
18. Keros V., Rosenlund B., Hultenby K. et al. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants // *Hum. Reprod.* – 2005. – Vol. 20, №6 – P. 1676–1687.
19. Kim K.J., Lee Y.A., Kim B.J. et al. Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing // *Cryobiology.* – 2015. – Vol. 70, №2. – P. 175–183.
20. Lee Y.A., Kim Y.H., Ha S.J. et al. Cryopreservation of porcine spermatogonial stem cells by slow-freezing testis tissue in trehalose // *Journal of Animal Science.* – 2014. – Vol. 92, №3. – P. 984–995.
21. Moss A.C., Higgins A.Z. Investigating the potential for cryopreservation of human granulocytes with concentrated glycerol // *Cryobiology.* – 2016. – Vol. 72, №3. – P. 290–293.
22. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays // *J. Immunol. Methods.* – 1983. – Vol. 65, №1–2. – P. 55–63.
23. Onofre J., Baert Y., Faes K., Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation // *Human Reproduction Update.* – 2016. – Vol. 22, №6. – P. 744–761.
24. Pelufo V., Lopez Armengol M.F., Malcotti V. et al. Effects of glycerol and sugar mixing temperature on the morphologic and functional integrity of cryopreserved ram sperm // *Theriogenology.* – 2015. – Vol. 83, №1. – P. 144–151.
25. Poirot C., Schubert B. Fertility preservation in prepubertal children // *Bull. Cancer.* – 2011. – Vol. 98, №5. – P. 489–499.
26. Rajotte R.V. Islet cryopreservation protocols // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 1999 – Vol. 875, №1. – P. 200–207.
27. Unni S., Kasiviswanathan S., D'Souza S. et al. Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant. *Fertil Steril.* – 2012. – Vol. 97. – P. 200–8.e201.
28. Volkova N.A., Pavlovich E.V., Gapon A.A., Nikolov O.T. Effects of millimeter-wave electromagnetic exposure on the morphology and function of human cryopreserved spermatozoa // *Bull. Exp. Biol. Med.* – 2014. – Vol. 157, №5. – P. 574–576.
29. Volkova N.A., Yukhta M.S., Yurchuk T.A. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow in therapy of chronic inflammation of the murine ovaries // *Biotechnologia Acta.* – 2014. – Vol. 7, №5. – P. 35–42.
30. Zhang J.M., Li L.X., Yang Y.X. et al. Is caspase inhibition a valid therapeutic strategy in cryopreservation of ovarian tissue? // *J. Assist. Reprod.* – 2009. – Vol. 26, №7. – P. 415–420.
13. Keros V., Hultenby K., Borgstrom B. et al. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Hum Reprod* 2007; 22(5): 1384–1395.
14. Keros V., Rosenlund B., Hultenby K. et al. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod* 2005; 20(6): 1676–1687.
15. Kim K.J., Lee Y.A., Kim B.J. et al. Cryopreservation of putative pre-pubertal bovine spermatogonial stem cells by slow freezing. *Cryobiology* 2015; 70(2): 175–183.
16. Kuleshova L.G., Gordienko E.A., Kovalenko I.F. Permeability of plasma membranes of rat hepatocytes for water molecules in a non-isotonic medium of electrolytes. *Biophysical Bulletin* 2002; 11(2): 39–42.
17. Lee Y.A., Kim Y.H., Ha S.J. et al. Cryopreservation of porcine spermatogonial stem cells by slow-freezing testis tissue in trehalose. *J Anim Sci* 2014; 92(3): 984–995.
18. Methods of clinical and experimental research in medicine / Ed. I.P. Kaidasheva. *Poltava*; 2003.
19. Moss A.C., Higgins A.Z. Investigating the potential for cryopreservation of human granulocytes with concentrated glycerol. *Cryobiology* 2016; 72(3): 290–293.
20. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65(1–2): 55–63.
21. Onofre J., Baert Y., Faes K., Goossens E. Cryopreservation of testicular tissue or testicular cell suspensions: a pivotal step in fertility preservation. *Hum Reprod Update* 2016; 22(6): 744–761.
22. Pelufo V., Lopez Armengol M.F., Malcotti V. et al. Effects of glycerol and sugar mixing temperature on the morphologic and functional integrity of cryopreserved ram sperm. *Theriogenology* 2015; 83(1): 144–151.
23. Poirot C., Schubert B. Fertility preservation in prepubertal children. *Bull Cancer* 2011; 98(5): 489–499.
24. Pushkar N.S., Shrago M.I., Belous A.M., Kalugin Yu.V. *Cryoprotectors.* Kyiv: Naukova Dumka; 1978.
25. Rajotte R.V. Islet cryopreservation protocols. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 875(1): 200–207.
26. Smolyaninova E.I., Khromenkova O.B., Zhernoklev G.V., Pishko O.V. Effect of equilibration in the freezing environment on osmotic stability and viability of mouse 8-cell embryos. *Probl Cryobiol* 2004; 1: 3–11.
27. Unni S., Kasiviswanathan S., D'Souza S. et al. Efficient cryopreservation of testicular tissue: effect of age, sample state, and concentration of cryoprotectant. *Fertil Steril* 2012; 97: 200-8.e201.
28. Volkova N.A., Pavlovich E.V., Gapon A.A., Nikolov O.T. Effects of millimeter-wave electromagnetic exposure on the morphology and function of human cryopreserved spermatozoa. *Bull Exp Biol Med* 2014; 157(5): 574–576.
29. Volkova N.A., Yukhta M.S., Yurchuk T.A. et al. Multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow in therapy of chronic inflammation of the murine ovaries. *Biotechnologia Acta* 2014; 7(5): 35–42.
30. Zhang J.M., Li L.X., Yang Y.X. et al. Is caspase inhibition a valid therapeutic strategy in cryopreservation of ovarian tissue? *J Assist Reprod* 2009; 26(7): 415–420.

