

УДК 612.617.1:615.014.41:539.21-022.532

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

## Визначення режимів відігріву для звитих канальців сім'яників щурів після вітрифікації

UDC 612.617.1:615.014.41:539.21-022.532

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

## Determination of Warming Modes for Seminiferous Tubules of Rat's Testes After Vitrification

**Ключові слова:** звиті канальці, сім'яник, вітрифікація, відігрів.

**Key words:** convoluted tubules, testis, vitrification, warming.

Розуміння важливості етапу відігріву та наступної реабілітації має вирішальне значення для покращення виживання тканини яєчок після вітрифікації. Під час відігріву кріоконсервовані тканини стикаються з такими токсичними та стресовими ситуаціями, як контакт із кріопротектором та осмотичний шок, що призводять до зниження життєздатності клітин [2]. Таким чином, визначення режимів відігріву необхідне для оптимізації протоколів кріоконсервування та підтримки більш високого відсотка живих клітин. З цієї точки зору адекватний час та температура відігріву важливі для мінімізації ушкоджень тканин. На сьогодні вітрифіковану тестикулярну тканину найчастіше відігривають при 22 та 37°C [3, 7]. Відомо, що швидкий вплив високих температур (50–70°C) сприятливий для ооцитів [4], однак умови відігріву за таких температур ніколи не оцінювалися для фрагментів звитих канальців сім'яників (ФЗКС) статевонезрілих щурів, у тому числі вітрифікованих, із використанням фібринового гелю. Попередні наші дослідження показали, що застосування фібринового гелю в якості основи середовища кріоконсервування є ефективним як за умов повільного охолодження, так і при вітрифікації ФЗКС статевонезрілих щурів [5, 6].

Мета роботи – визначення впливу режимів відігріву на морфофункціональні характеристики вітрифікованих фрагментів звитих канальців сім'яників статевонезрілих щурів.

Understanding the importance of the warm-up phase and subsequent rehabilitation is critical to improving testicular tissue survival after vitrification. During warming the cryopreserved tissues face such toxic and stressful factors as contact with the cryoprotectant and osmotic shock, leading to a decrease in cell viability [2]. Thus, the determination of warming modes is necessary to optimize the cryopreservation protocols and maintain a higher percentage of living cells. From this point of view, the adequate warming time and temperature are crucial to minimize a tissue injury. Today, the vitrified testicular tissue is most often warmed at 22 and 37°C [3, 7]. The rapid effect of high temperatures (50–70°C) is known to be favorable for oocytes [4], but the warming conditions at such temperatures have never been evaluated for the fragments of seminiferous tubules of testes (FSTT) of immature rats, including vitrified, using fibrin gel. Our previous studies have shown that the use of fibrin gel as the basis for the cryopreservation medium is effective both under slow cooling and during vitrification of FSTT of immature rats [5, 6].

The study was aimed to determine the effect of warming modes on morphofunctional characteristics of vitrified fragments of the convoluted tubules of the immature rats' testes.

The experiments were performed in accordance with the Law of Ukraine 'On the Protection of Animals

Відділ кріопатофізіології і 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, Pereyaslavska str., Kharkiv, Ukraine 61016;  
tel.: +380 57 373 7435, fax: +380 57 373 5952  
e-mail: volkovana781@gmail.com

Надійшла 21.07.2020

Прийнята до друку 08.02.2021

Received July, 07, 2020

Accepted February, 08, 2021

© 2021 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.

Експерименти проводили відповідно до Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) із дотриманням вимог комітету з біоетики Інституту, узгоджених із положенням «Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986).

У роботі використовували статевонезрілих (7–8 тижнів) щурів-самців. У тварин відсікали обидва сім'яники, з яких видаляли білкову оболонку та середостіння, а звиті сім'яні каналця розрізали на фрагменти, з яких робили навіски масою ( $25 \pm 3$ ) мг та розміром 2–3 мм<sup>3</sup>. Кріоконсервування ФЗКС щурів проводили шляхом вітрифікації за методикою N.O. Volkova та співавт. [5], відігрівали послідовним їх перенесенням ( $n = 15$ ) у розчин сахарози з концентрацією, яка знижувалася (1; 0,5; 0,25; 0 М). Температура розчину 1М сахарози була 22°C (режим 1), 50°C (режим 2) та 70°C (режим 3). Наступні розчини сахарози мали температуру 22°C. Інкубація тривала по 5 хв у кожному середовищі. Контрольні зразки відігрівали при 37°C за тих самих умов, що й дослідні. Одразу після відігріву зразки перенесли у розчин Хенкса (22°C, 5 хв). З кожної групи зразків брали 5 фрагментів для гістологічного дослідження, 5 фрагментів для визначення метаболічної активності (МТТ-тест), із 5 фрагментів готували гомогенат, який пропускали крізь капроновий фільтр та центрифугували (5 хв, 840g). У супернатанті оцінювали: активність лактатдегідрогенази (ЛДГ), гамма-глутатіон трансферази (ГТТ), системи антиоксидантного захисту (АОЗ), а також визначали вміст загального білка. Вимірювання проводили на біохімічному аналізаторі СЕМ 7 («ERBA» Чеська Республіка) за допомогою відповідних тест-систем («Randox», Велика Британія). Активність досліджених показників розраховували на 1 мг білка. Для гістологічних досліджень парафінові зрізи ФЗКС товщиною 7 мкм забарвлювали гематоксилином і еозином. Світлову мікроскопію проводили за допомогою мікроскопа «Carl Zeiss Axio Observer Z1» («Carl Zeiss», Німеччина). Значущість відмінностей між групами оцінювали за допомогою критерію Манна-Уїтні з використанням програми «Statistika 8» («StatSoft», США). Критичний рівень значущості приймався рівним 0,05. Результати в таблицях представлені у вигляді Me (min-max), де Me – медіана; min-max – розмах вибірки.

Результати впливу режимів відігріву на функціональну активність звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів після вітрифікації наведено в табл. 1. Після вітрифікації-відігріву ФЗКС за режимом 2 метаболічна активність (дані МТТ-тесту) була

Against Cruelty' (№ 3447-IV of February 21<sup>st</sup>, 2006) in compliance with the requirements of the Institute's Bioethics Committee, consistent with the provisions of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used in Experimental and Other Scientific Purposes (Strasbourg, 1986).

Immature (7–8 weeks old) male rats were under investigation. In animals both testes were dissected, from which the protein shell and mediastinum were removed, and the convoluted seminal tubules were cut into fragments, from which the samples weighing ( $25 \pm 3$ ) mg and of 2–3 mm<sup>3</sup> size were made. The FSTT of rats were cryopreserved by vitrification according to the method of N.O. Volkova *et al.* [5], then they were warmed by a successive transfer ( $n = 15$ ) to sucrose solution with a decreasing concentration (1; 0.5; 0.25; 0 M). The temperature of 1M sucrose solution was 22°C (mode 1), 50°C (mode 2) and 70°C (mode 3). Subsequent sucrose solutions had a temperature of 22°C. Incubation lasted 5 minutes in each medium. Control samples were warmed at 37°C under the same conditions as the experimental ones. Immediately after warming, the samples were transferred to Hanks' solution (22°C, 5 min). From each group of samples 5 fragments were taken for histological examination, 5 fragments were selected for determination of metabolic activity (MTT test), from 5 fragments a homogenate was prepared, which was passed through a nylon filter and centrifuged (5 min, 840g). The supernatant was evaluated for: lactate dehydrogenase (LDH) activity, gamma-glutathione transferase (GGT), total antioxidant systems (TAS), and total protein content was determined. Measurements were performed with a biochemical analyzer CHEM 7 (ERBA, Czech Republic) using appropriate test systems (Randox, UK). The activity of the studied indices was calculated per 1 mg of protein. For histological examination, paraffin sections of FSTT of 7 μm thickness were stained with hematoxylin and eosin. Light microscopy was performed using a microscope 'Carl Zeiss Axio Observer Z1' (Carl Zeiss, Germany). Significance of differences between the groups was assessed using the Mann-Whitney test by means of the 'Statistics 8' software ('StatSoft', USA). The critical significance level was assumed to be 0.05. The results in the Tables are presented as Me (min-max), where Me is the median; min-max is the sample size.

The results of the influence of warming modes on functional activity of the convoluted tubules of immature rats' testes after vitrification are presented in Table 1. After vitrification-rewarming of FSTT with mode 2 the metabolic activity (MTT test data) was 1.56 times higher than the control. The use of modes 1 and 3 did not significantly change the studied index compared to the control samples.



**Таблиця 1.** Вплив режимів відігріву на функціональну активність деконсервованих ФЗКС статево незрілих щурів ( $n = 5$ )

**Table 1.** Influence of warming modes on functional activity of cryopreserved FSTT of immature rats ( $n = 5$ )

Зразок Sample	МТТ, ум.од./мг тканини MTT, units/mg tissue	ЛДГ, МОд/мг білка LDH, units/mg protein	ГГТ, МОд/мг білка GGT, units/mg protein	АОЗ, мМоль/мг білка TAS, mM/mg protein
Контроль (37°C) Control (37°C)	0,34(0,19–0,45)	33,8(29,1–35,6)	2,4(2,0–2,9)	11,7(10,9–12,8)
Режим 1 (22°C) Mode (22°C)	0,27(0,15–0,4)	18,3*(15,2–21,1)	2,4(1,9–2,9)	4,0*(2,8–5,3)
Режим 2 (50°C) Mode (50°C)	0,53*(0,49–0,68)	37,5(30,3–44,2)	3,9*(3,2–4,5)	17,4*(15,5–18,3)
Режим 3 (70°C) Mode (70°C)	0,32(0,21–0,51)	23,6*(18,2–27,7)	2,7(2,0–3,3)	9,7(9,2–10,7)

**Примітка:** \* – відмінності значущі порівняно з контролем,  $p < 0,05$ .

**Note:** \* – differences are significant if compared with the control,  $p < 0.05$ .

в 1,56 раза вище відносно контролю. Використання режимів 1 та 3 значуще не змінювало досліджений показник порівняно з контрольними зразками.

Загальна активність ЛДГ у супернатанті ФЗКС після вітрифікації-відігріву за режимами 1 та 3 була відповідно в 1,85 та 1,43 раза нижче відносно контрольних показників. Результати визначення активності ГГТ у ФЗКС щурів свідчили, що відігрів за режимами 1 та 3 не викликав статистично значущих змін, а після застосування режиму 2 даний показник збільшився в 1,63 раза відносно контролю. Активність системи АОЗ у ФЗКС щурів після використання режиму 2 була вище в 1,49 раза відносно контролю. В зразках, які відігрівали за режимом 1, показник стану АОЗ був в 2,93 раза нижче за контрольний, а після використання режиму 3 він відповідав контролю.

Відомо, що окислювальний стрес пригнічує метаболічну активність, порушує стероїдогенез, активізує процеси апоптозу в клітинах сперматогенного епітелію [1]. Про/антиоксидантний дисбаланс може призвести до пошкодження структури спермія, компонентів цитоплазматичної мембрани, білків, ферментів та ДНК [8]. Саме тому під час криоконсервування ФЗКС щурів важливим є збереження ферментативної та метаболічної активності, а також системи АОЗ, що в нашому дослідженні найкраще досягалося відігрівом за режимом 2.

Результати світлової мікроскопії гістологічних препаратів показали, що в групі контролю незмінними залишалося більше половини ядер клітин сперматогенного епітелію (табл. 2), а серед ушкоджень пере-

Total activity of LDH in the FSTT supernatant after vitrification-warming with the modes 1 and 3 was respectively 1.85 and 1.43 times lower than the control values. The results of determining the activity of GGT in rats' FSTT showed that the warm-up with the modes 1 and 3 did not cause statistically significant changes, and after the application of mode 2, this figure increased 1.63 times relative to the control. The activity of the TAS in rats' FSTT after the use of mode 2 was 1.49 times higher relative to the control. In the samples, which were warmed with mode 1, the rate of TAS was 2.93 times lower than the control, and after using mode 3, it corresponded to the control.

**Таблиця 2.** Вплив режимів відігріву на стан ядер клітин сперматогенного епітелію деконсервованих ФЗКС статево незрілих щурів ( $n = 5$ )

**Table 2.** Influence of warming modes on spermatogenic epithelium sperm cells of cryopreserved FSTT of immature rats ( $n = 5$ )

Зразок Sample	Стан ядер, % State of nuclei			
	Неушкоджені Non-damaged	Каріопікноз Karyopicnosis	Каріорексис Karyorhexis	Каріолізис Karyolysis
Контроль (37°C) Control (37°C)	50(46–59)	30(27–36)	10(8–11)	7(6–8)
Режим 1 (22°C) Mode (22°C)	29(27–38)*	40(38–50)*	7(5–8)	17(15–22)*
Режим 2 (50°C) Mode (50°C)	59(54–66)	25(20–30)*	9(8–11)	7(5–9)
Режим 3 (70°C) Mode (70°C)	45(40–47)*	37(31–39)	8(7–10)	13(8–15)*

**Примітка:** \* – відмінності значущі порівняно з контролем,  $p < 0,05$ .

**Note:** \* – differences are significant if compared with the control,  $p < 0.05$ .



важав каріопікноз (ущільнення, зморщення, базофілія). В зразках, відігрітих за режимом 1, частота деструкції ядер збільшувалася порівняно з контролем. При цьому, крім пікнотичних змін, виявлялися осередки клітин із каріолізисом. У разі відігріву ФЗКС за режимом 2 явища пікнозу спостерігалися меншою мірою, а кількість клітин із лізованими ядрами не збільшувалася порівняно з групою контролю. В даній дослідній групі морфологічно неушкодженими залишалася найбільша кількість ядер герміногенних клітин. Морфологічне дослідження показало, що відігрів за режимом 3 поступався результатам, отриманим у групі контролю. Частота загибелі клітин, що була асоційована з каріорексісом, була однаковою у всіх досліджуваних групах.

Отже, на основі аналізу показників гістоморфологічного дослідження, МТТ-тесту, активності ГГТ, ЛДГ, системи АОЗ встановлено, що для відігріву ФЗКС статевонезрілих щурів після кріоконсервування шляхом вітрифікації оптимальним є швидкий режим переносу зразків безпосередньо в середовище з температурою 50°C. Оптимізація умов відігріву ФЗКС статевонезрілих щурів може сприяти покращенню протоколів кріоконсервування та реабілітації тканин.

## Література

1. Cardoso JP, Cocuzza M, Elterman D. Optimizing male fertility: oxidative stress and the use of antioxidants. *World J Urol.* 2019; 37(6): 1029–34.
2. Lima DBC, Silva TFP, Aquino-Cortez A, et al. Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. *Theriogenology.* 2018; 110(4): 110–5.
3. Poels J, Van Langendonck A, Dehoux JP, et al. Vitrification of non-human primate immature testicular tissue allows maintenance of proliferating spermatogonial cells after xenografting to recipient mice. *Theriogenology.* 2012; 77(5): 1008–13.
4. Shinsuke S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology.* 2009; 59(1): 75–82.
5. Volkova NO, Yukhta MS, Chernyshenko LG, et al. Cryopreservation of rat seminiferous tubules using biopolymers and slow non-controlled rate cooling. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2018; 28(4): 278–92.
6. Volkova NO, Yukhta MS, Goltsev AM. Vitrification of rat testicular tissue using biopolymers. *Biopolym Cell.* 2020; 36(2): 122–32.
7. Wu J, Hu T, Guo B, et al. Cryopreservation of adult bovine testicular tissue for spermatogonia enrichment. *CryoLetters.* 2011; 32(5): 402–9.

It is known that oxidative stress inhibits metabolic activity, disrupts steroidogenesis, activates an apoptosis in spermatogenic epithelial cells [1]. Pro- /antioxidant imbalance can damage the structure of sperm, cytoplasmic membrane components, proteins, enzymes and DNA [8]. That is why during the cryopreservation of rats' FSTT it is important to preserve the enzymatic and metabolic activity, as well as the TAS, which in our study was best achieved by warming with mode 2.

The results of light microscopy of histological preparations showed that in the control group more than half of the nuclei of spermatogenic epithelial cells have remained unchanged (Table 2), and karyopyknosis (compaction, wrinkling, basophilia) dominated among the lesions. In the samples warmed using the mode 1, the frequency of the nuclei destruction increased compared with the control. In this case, in addition to pyknotic changes, the cells with karyolysis were detected. When the FSTT were warmed with mode 2, the phenomena of pyknosis were observed to a lesser extent, and the number of cells with lysed nuclei did not increase if compared with the control group. In this experimental group, the largest number of nuclei of germinogenic cells remained morphologically intact. Morphological study showed that the warm-up mode 3 was inferior to the results obtained in the control group. The frequency of cell death associated with karyorrhexis was the same for all the groups studied.

Therefore, based on the analysis of histomorphological examination, MTT test, GGT activity, LDH, TAS, it was found that for warming FSTT of immature rats after cryopreservation by vitrification, the optimal mode of transfer of samples directly into the medium with a temperature of 50°C. Optimizing the warming conditions for the FSTT of immature rats can help to improve the cryopreservation and tissue rehabilitation protocols.

## References

1. Cardoso JP, Cocuzza M, Elterman D. Optimizing male fertility: oxidative stress and the use of antioxidants. *World J Urol.* 2019; 37(6): 1029–34.
2. Lima DBC, Silva TFP, Aquino-Cortez A, et al. Vitrification of testicular tissue from prepubertal cats in cryotubes using different cryoprotectant associations. *Theriogenology.* 2018; 110(4): 110–5.
3. Poels J, Van Langendonck A, Dehoux JP, et al. Vitrification of non-human primate immature testicular tissue allows maintenance of proliferating spermatogonial cells after xenografting to recipient mice. *Theriogenology.* 2012; 77(5): 1008–13.
4. Shinsuke S, Mazur P. The dominance of warming rate over cooling rate in the survival of mouse oocytes subjected to a vitrification procedure. *Cryobiology.* 2009; 59(1): 75–82.



8. Zhang J, Xue H, Qiu F, et al. Testicular spermatozoon is superior to ejaculated spermatozoon for intracytoplasmic sperm injection to achieve pregnancy in infertile males with high sperm DNA damage. *Andrologia*. 2019; 51(2): e13175.
5. Volkova NO, Yukhta MS, Chernyshenko LG, et al. Cryopreservation of rat seminiferous tubules using biopolymers and slow non-controlled rate cooling. *Probl Cryobiol Cryomed*. 2018; 28(4): 278–92.
6. Volkova NO, Yukhta MS, Goltsev AM. Vitrification of rat testicular tissue using biopolymers. *Biopolym Cell*. 2020; 36(2): 122–32.
7. Wu J, Hu T, Guo B, et al. Cryopreservation of adult bovine testicular tissue for spermatogonia enrichment. *Cryo-Letters*. 2011; 32(5): 402–9.
8. Zhang J, Xue H, Qiu F, et al. Testicular spermatozoon is superior to ejaculated spermatozoon for intracytoplasmic sperm injection to achieve pregnancy in infertile males with high sperm DNA damage. *Andrologia*. 2019; 51(2): e13175.

