

DOI 10.29254/2077-4214-2019-1-2-149-67-70

УДК 612.617.1:615.014.41:539.21-022.532

Волкова Н. О., Юхта М. С., Чернищенко Л. Г., Степанюк Л. В., Сокіл Л. В., Гольцев А. М.

## ЗАСТОСУВАННЯ БІОПОЛІМЕРІВ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ ТЕСТИКУЛЯРНОЇ ТКАНИНИ ЩУРІВ

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України (м. Харків)

volkovana781@gmail.com

**Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.** Роботу виконано згідно з планом науково-дослідної роботи відділу кріопатофізіології та імунології ІПКіК НАН України у рамках відомчої тематики: «Оптимізація методів кріоконсервування тканин звитих каналців сім'яників щурів з використанням полімерних носіїв і наноматеріалів» (№ державної реєстрації 0116U003489). Робота проведена за підтримкою бюджетної програми НАН України «Підтримка розвитку пріоритетних напрямів наукових досліджень» (КПВК 5641230), договір № 2.2.6.99.

**Вступ.** Кріоконсервування тканини тестисів – метод, який може сприяти збереженню репродуктивного потенціалу у різних видів тварин і людини [1], адже ця тканина містить сперматогонії, з яких в процесі сперматогенезу утворюються сперматозоїди. Після заморожування-відігріву сперматогенез може бути завершений *in vitro* або *in vivo*, а отримані сперматозоїди можна використовувати для запліднення методом внутрішньоцитоплазматичної ін'єкції [2]. Ця біотехнологія є єдиним способом збереження фертильності молодих пацієнтів, яким показана терапія онкозахворювань.

В даний час немає стандартизованого протоколу кріоконсервування тестикулярної тканини. Більшість центрів використовують програмне заморожування під захистом диметилсульfoxиду (ДМСО) або його поєднання з сахарозою [3]. Кілька досліджень продемонстрували перевагу ДМСО для кріоконсервування тканини тестисів над іншими кріопротекторами [4,5]. Крім того, ксенотрансплантація кріоконсервованої під захистом ДМСО тестикулярної тканини статевонезрілих макак-резус показала можливість індукції сперматогенезу [6].

Проте Ohta Н. зі співавторами показали, що під час кріоконсервування відбувається втрата сперматогоніальних стовбурових клітин. Тому ефективність процедури кріоконсервування є критичною і повинна бути удосконалена [7]. Перспективним підходом є використання біополімерних гелів, адже наявність позаклітинного матриксу може впливати на структуру льоду, що утворюється на етапах охолодження. Попередні наші дослідження показали, що застосування біополімерів на етапі експозиції зменшувало токсичний вплив ДМСО на клітини сперматогенного епітелію та дозволяло збільшити строк експозиції [8,9].

**Мета роботи** – визначення впливу біополімерів на збереження морфологічних характеристик та функціонального стану фрагментів звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів за умов програмного заморожування.

**Об'єкт і методи дослідження.** Усі маніпуляції з тваринами проводили згідно з положеннями Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей. Сім'яні каналця отримували механічним шляхом з обох сім'яників статевонезрілих щурів (n=20, масою 50±15 г, віком 7-8 тижнів). З одержаного матеріалу робили нависки масою 75±3 мг і розмірами від 6 до 8 мм<sup>3</sup>.

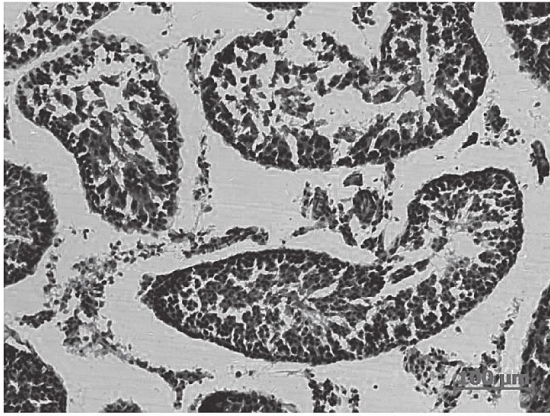
Експериментальні групи: 1. колагеновий гель (КГ) + 5% ДМСО (ПанЕко, Росія) (n=5); 2. фібриновий гель (ФГ) + 5% ДМСО (n=5). Контрольні групи: 1. розчин Хенкса (РАА, Австрія) + 5% бичачий сироватковий альбумін (БСА) (РАА) + 5% ДМСО (n=5); 2. розчин Хенкса без кріопротектору (негативний контроль) (n=5); 3. нативна тканина (інтактний контроль) (n=5). Для приготування КГ використовували колаген І типу, який отримували із сухожил хвостів щурів за стандартною методикою [10]. ФГ отримували з середньої фракції свіжої крові тварин після центрифугування (12 хв, 1500 г).

Звити каналці сім'яників щурів інкубували в середовищах протягом 30 хв (4°C) та кріоконсервували з використанням заморожувача ЗП-10 (СКТБ ДВ ІПКіК НАН України) за програмою: охолодження до 0°C зі швидкістю 1°C/хв; зупинка 5 хв при 0°C; охолодження до -8°C зі швидкістю 1°C/хв; зупинка 1 хв при -8°C; охолодження до -40°C зі швидкістю 1°C/хв та до -70°C зі швидкістю 10°C/хв; переніс у рідкий азот. Зразки зберігали в умовах кріобанку впродовж місяця, після чого відігрівали на водяній бані при 40°C до рідкої фази. Кріопротектор видаляли шляхом трьохетапної зміни кріозахисного середовища на розчин Хенкса.

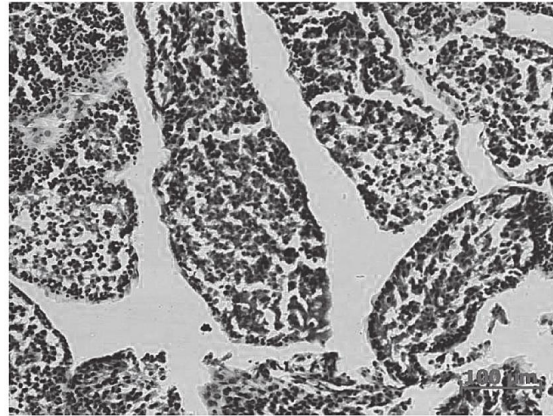
Для гістологічних досліджень зрізи звитих каналців товщиною 7 мкм фарбували гематоксиліном і еозином та досліджували під мікроскопом «LSM 510 Meta» («Carl Zeiss», Німеччина). Метаболічну активність досліджували за допомогою МТТ-тесту [11] при довжині хвилі 540 нм. Загальну активність лактатдегідрогенази (ЛДГ) вимірювали за допомогою тест-набору реактивів «ЛДГ» («Філісіт-Діагностика», Україна) відповідно до інструкції виробника.

Перевірка нормальності розподілу кількісних ознак проводилася за спільним критерієм перевірки на симетричність і нульового коефіцієнту ексцесу. Достовірність відмінностей між групами оцінювали за допомогою t-критерію Стьюдента з використанням пакетів програм «Microsoft Excel» та «Statistika 8». Критичне значення рівня значущості приймалося рівним 0,05.

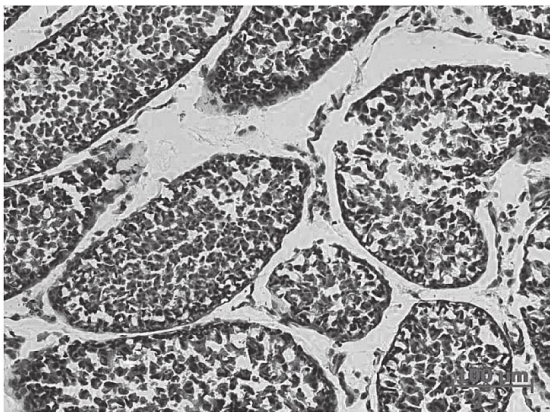
**Результати дослідження та їх обговорення.** Гістологічно, сім'яні каналця щурів інтактної групи мали нормальну структурну організацію. Кріоконсервуван-



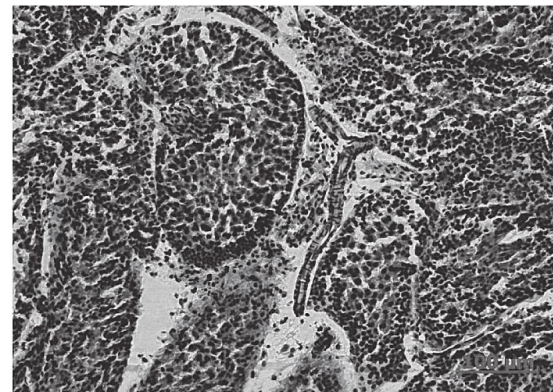
Негативний контроль



БСА + 5% ДМСО

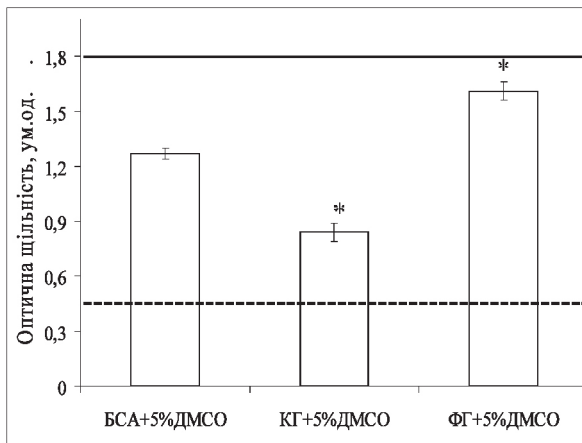


КГ + 5% ДМСО

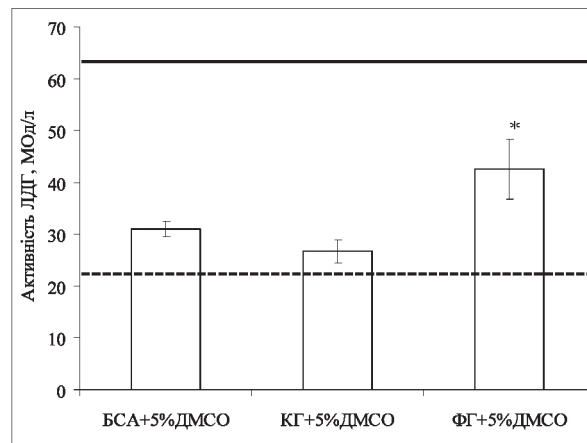


ФГ + 5% ДМСО

Рис. 1. Звіти каналця сім'яників статевонезрілих щурів після кріоконсервування. Забарвлення гематоксилином та еозином, збільшення  $\times 150$ .



А



Б

Рис. 2. Метаболічна активність за МТТ-тестом (А) та активність ЛДГ (Б) в зразках звитих каналців сім'яників після кріоконсервування.

Примітки: суцільна лінія – показник інтактного контролю; пунктирна лінія – показник негативного контролю; \* – різниця вірогідна відносно відповідного кріопротектору ( $p < 0,05$ ;  $n = 5$ ).

ня звитих каналців без кріопротекторів (негативний контроль) (рис. 1) викликало грубі порушення їх гістоструктури: різка ретракція клітин з утворенням великих тріщин всередині сперматогенного епітелію, його повна десквамація, лізис і пікноз майже 90% ядер.

Використання БСА та КГ у комбінації з 5% ДМСО сприяло зниженню ступеню ретракції і десквамації, кількості і розміру сферичних порожнин в сперматогенному епітелію. У випадку застосування ФГ з 5% ДМСО поряд з наведеними змінами відбувалося



зменшення кількості клітин з пікнотичними ядрами (рис. 1).

Метаболічна активність клітин звитих каналців та активність ЛДГ після кріоконсервування в усіх випадках знижувалася відносно інтактного контролю. Проте за даними МТТ-тесту кріоконсервування під захистом ФГ з 5% ДМСО було ефективнішим порівняно з негативним контролем та БСА + 5% ДМСО в 3,9 та 1,3 рази відповідно. Загальна активність ЛДГ в зразках кріоконсервованих під захистом ФГ з 5% ДМСО була в 1,6 та 1,4 рази вище негативного контролю та БСА + 5% ДМСО відповідно. Застосування КГ виявилось менш ефективним в обох дослідженнях (рис. 2).

Аналіз отриманих даних свідчить про те, що використання ФГ у складі кріозахисного середовища підвищує стійкість клітин звитих каналців статевонезрілих щурів до дії низьких температур.

**Висновки.** Кріоконсервування звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів з застосуванням фібринового гелю є більш ефективним у порівнянні з БСА та колагеновим гелем.

**Перспективи подальших досліджень.** Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки ефективних методик кріоконсервування звитих каналців сім'яників з використанням біополімерних носіїв для створення кріобанків незрілої тестикулярної тканини з метою відновлення фертильності.

### Література

1. Lima D, Silva T, Morais GB, Aquino-Cortez A, Evangelista J, Xavier Junior F, et al. Different associations of cryoprotectants for testicular tissue of prepubertal cats submitted to vitrification. *Reprod Domest Anim.* 2017;52(2):235-41.
2. Yokonishi T, Sato T, Komeya M, Katagiri K, Kubota Y, Nakabayashi K, et al. Offspring production with sperm grown in vitro from cryopreserved testis tissues. *Nat Commun.* 2014;5:4320.
3. Suzuki N, Donnez J, editors. *Gonadal Tissue Cryopreservation in Fertility Preservation.* Springer Japan; 2016. 192 p.
4. Keros V, Hultenby K, Borgstrom B, Fridstrom M, Jahnukainen K, Hovatta O. Methods of cryopreservation of testicular tissue with viable spermatogonia in pre-pubertal boys undergoing gonadotoxic cancer treatment. *Hum Reprod.* 2007;22:1384-95.
5. Keros V, Rosenlund B, Hultenby K, Aghajanova L, Levkov L, Hovatta O. Optimizing cryopreservation of human testicular tissue: comparison of protocols with glycerol, propanediol and dimethylsulphoxide as cryoprotectants. *Hum Reprod.* 2005;20:1676-87.
6. Jahnukainen K, Ehmcke J, Hergenrother SD, Schlatt S. Effect of cold storage and cryopreservation of immature nonhuman primate testicular tissue on spermatogonial stem cell potential in xenografts. *Hum Reprod.* 2007;22:1060-7.
7. Ohta H, Wakayama T. Generation of normal progeny by intracytoplasmic sperm injection following grafting of testicular tissue from cloned mice that died postnatally. *Biol Reprod.* 2005;73(3):390-5.
8. Volkova NO, Yukhta MS, Chernyshenko LG, Stepanyuk LV, Sokol LV, Goltsev AM. Exposure of seminiferous tubules of immature rats to cryoprotective media of various compositions. *Probl Cryobiol Cryomed.* 2017;27(3):203-18.
9. Volkova N, Yukhta M, Goltsev A. Biopolymer gels as a basis of cryoprotective medium for testicular tissue of rats. *Cell and tissue banking.* 2018;19(4):819-26.
10. Chandrakasan G, Torchia DA, Piez KA. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution. *J Biol Chem.* 1976;251:6062-7.
11. 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.

### ЗАСТОСУВАННЯ БІОПОЛІМЕРІВ ПРИ КРІОКОНСЕРВУВАННІ ТЕСТИКУЛЯРНОЇ ТКАНИНИ ЩУРІВ

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

**Резюме.** Метою роботи було визначення впливу колагенового (КГ) та фібринового (ФГ) гелів на морфофункціональні характеристики фрагментів звитих каналців сім'яників статевонезрілих щурів за умов програмного заморожування. Встановлено, що кріоконсервування фрагментів сім'яних каналців під захистом кріосередовища на основі ФГ дозволяє зберегти їх гістоструктуру та метаболічну активність і є більш результативним, ніж застосування розчину Хенкса з БСА. За результатами гістологічного дослідження ФГ з 5% ДМСО (на відміну від КГ) зменшував вираженість явищ десквамації та ретракції сперматогенних клітин, а також кількість клітин з пікнотичними ядрами. Схожа тенденція спостерігалась і при дослідженні метаболічної активності (МТТ-тест) та активності ЛДГ в клітинах звитих каналців після кріоконсервування. Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки ефективних методик кріоконсервування звитих каналців сім'яників з використанням біополімерних гелів для створення кріобанків незрілої тестикулярної тканини.

**Ключові слова:** тестикулярна тканина, статевонезрілі щури, диметилсульфоксид, кріоконсервування, бичачий сироватковий альбумін, колагеновий гель, фібриновий гель.

### ПРИМЕНЕНИЕ БИОПОЛИМЕРОВ ПРИ КРИОКОНСЕРВИРОВАНИИ ТЕСТИКУЛЯРНОЙ ТКАНИ КРЫС

**Волкова Н. А., Юхта М. С., Чернышенко Л. Г., Степанюк Л. В., Сокол Л. В., Гольцев А. Н.**

**Резюме.** Целью работы было определение влияния коллагенового (КГ) и фибринового (ФГ) гелей на морфофункциональные характеристики фрагментов извитых канальцев семенников неполовозрелых крыс в условиях программного замораживания. Установлено, что криоконсервирование фрагментов семенных канальцев под защитой криозащитной среды на основе ФГ позволяет сохранить их гистоструктуру и метаболическую активность и есть более результативным, чем применение раствора Хэнкса с БСА. По результатам гистологического исследования ФГ с 5% ДМСО (в отличие от КГ) уменьшал выраженность явлений десквамации и ретракции сперматогенных клеток, а также количество клеток с пикнотичными ядрами. Похожая тенденция наблюдалась и при исследовании метаболической активности (МТТ-тест) и активности ЛДГ в клетках извитых канальцев после криоконсервирования. Полученные данные могут быть использованы для обоснования и разработки эффективных методик криоконсервирования извитых канальцев семенников с использованием биополімерных гелей для создания кріобанков незрелой тестикулярной ткани.

**Ключевые слова:** тестикулярная ткань, неполовозрелые крысы, диметилсульфоксид, криоконсервирование, бычий сывороточный альбумин, коллагеновый гель, фибриновий гель.

**APPLICATION OF BIOPOLYMERS FOR CRYOPRESERVATION OF RAT TESTICULAR TISSUE****Volkova N. O., Yukhta M. S., Chernyshenko L. G., Stepanyuk L. V., Sokil L. V., Goltsev A. M.**

**Abstract.** Today, transplantation of cryopreserved fragments of immature testicles is a non-alternative way for fertility preserving in pre-adolescent patients, which has been planned cytotoxic therapy. However, loss of spermatogonial stem cells occurs during cryopreservation. Therefore, the effectiveness of the cryopreservation procedure is critical and should be improved. A promising approach is to use biopolymer gels, since the presence of an extracellular matrix may affect the structure of ice crystals during cryopreservation.

*The aim* of the work was to determine the effect of collagen (CG) and fibrin (FG) gels on the morphological and functional characteristics of the fragments of the seminiferous tubules of the testes of immature rats in a programmed freezing condition.

*Object and methods.* The following experimental cryoprotective media were used: 1. collagen gel (CG) with 5% DMSO; 2. fibrin gel (FG) with 5% DMSO. Controls: 1. Hanks' solution with 5% bovine serum albumin (BSA) and 5% DMSO; 2. Hanks' solution without cryoprotectant; 3. intact tissue. CG was prepared from collagen type I, which was obtained from rat tendons. FG was obtained from an average fraction of fresh blood of animals after centrifugation (12 min, 1500 g).

Samples of seminiferous tubules were obtained mechanically from both testes of immature rats ( $n = 50$ , weighing  $50 \pm 15$  g, aged 7-8 weeks), incubated in media for 30 min ( $4^{\circ}\text{C}$ ) and cryopreserved according to the program: ramp to  $0^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; hold for 5 min at  $0^{\circ}\text{C}$ ; ramp to  $-8^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; hold for 1 min at  $-8^{\circ}\text{C}$ ; ramp to  $-40^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$  and up to  $-70^{\circ}\text{C}$  at a rate of  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ; transferred to liquid nitrogen. After heating the histological structure and the metabolic activity (MTT test and LDH activity) of spermatogenic epithelium cells was evaluated.

*Results.* Histologically, testicular tissue of intact rats had a normal structural organization. Cryopreservation without cryoprotectants (negative control) caused gross damages of structure of seminiferous tubules: a sharp retraction of cells with the formation of large cracks inside the spermatogenic epithelium, its complete desquamation, lysis and picnosis of almost 90% of nuclei. The spermatogenic epithelium after cryopreservation under protection of BSA + 5% DMSO had moderately pronounced changes: the degree of retraction and desquamation, the number and size of the cavities decreased. The use of FG with 5% DMSO (as opposed to CG) led to a decrease in the severity of desquamation and retraction of spermatogenic cells, as well as in the number of cells with pyknotic nuclei, compared to the use of BSA instead biopolymer gel.

According to the MTT-test, cryopreservation under the protection of FG with 5% DMSO was in 3.9 times more effective compared to the negative control, exceeding by 27% the result of application of BSA as the basis of the cryoprotective medium. A similar trend was observed during LDH activity determination: in the group of FG + 5% DMSO application LDG activity was increased in 1.6 times in relation to negative control. The use of CG was less effective by both parameters.

In general, the obtained data indicate that the use of FG as a basis of cryoprotective medium increases the resistance of the cells of the seminiferous tubules of immature rats to the action of factors of cryopreservation.

*Conclusion.* Cryopreservation of fragments of the seminiferous tubules under the protection of a cryoprotective medium based on FG allows preserving their histostructure and metabolic activity and is more effective than the use of BSA or CG.

**Key words:** testicular tissue, immature rats, dimethyl sulfoxide, cryopreservation, bovine serum albumin, collagen gel, fibrin gel.

*Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.  
Стаття надійшла 13.03.2019 року*

DOI 10.29254/2077-4214-2019-1-2-149-70-75

УДК 612.172: 611.127-018

<sup>1</sup>Загоруйко Ю. В., Загоруйко Г. Е., Марциновский В. П., <sup>2</sup>Филатова В. Л.

**ЗАКОНОМЕРНОСТИ КАРДИОМИОГЕНЕЗА У КРЫС WISTAR: РОСТ СУММАРНОЙ ЧИСЛЕННОСТИ КАРДИОМИОЦИТОВ И ОБРАЗОВАНИЕ ПОПУЛЯЦИИ ДВУЯДЕРНЫХ МИОЦИТОВ В ПАРЕНХИМЕ МИОКАРДА КОМПЛЕКСА (ЛЖ + МЖП)**

Ровненский государственный гуманитарный университет (г. Ровны)

<sup>1</sup>Харьковский национальный медицинский университет (г. Харьков)

<sup>2</sup>Украинская медицинская стоматологическая академия (г. Полтава)

prof.zagoruykoGE@gmail.com

**Связь публикации с плановыми научно-исследовательскими работами.** Исследование проведено в соответствии с тематикой НИР «Морфофункциональный стан органів і тканин експериментальних тварин та людини в онтогенезі в нормі та під впливом зовнішніх і внутрішніх чинників», № государственной регистрации 0117U003181.

**Вступление.** Проблемы миогенеза скелетной мышечной ткани [1] и кардиомиогенеза [2-6] привлекают пристальное внимание ученых на протяжении многих

десятилетий. Одной из проблем кардиомиогенеза является исследование закономерностей пролиферативных процессов, развивающихся в миокарде в период эмбрионального и постнатального онтогенеза позвоночных животных и человека [2-6]. Пролиферация кардиомиоцитов (КМЦ) способствует росту массы и объема миокарда, формированию четырехкамерного сердца, которое начинает активно сокращаться с 15 суток пренатального развития крысят Wistar. По данным [6,7] в миокарде 19-ти суточных эмбрионов