DOI 10.29254/2077-4214-2020-2-156-249-253
УДК 612.617.1:615.014.41:539.21-022.532

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

ВПЛИВ РЕЖИМІВ ВІДІГРІВУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЗВИТИХ КАНАЛЬЦІВ СІМ'ЯНИКІВ

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: «Кріоконсервування сперматогоніальних стовбурових та акцесорно-регуляторних клітин сім'яників з використанням біополімерних гелів» (№ державної реєстрації 0120U100381).

Вступ. Перспективним напрямком сучасних біотехнологій є використання кріобіологічних розробок у репродуктивній медицині, андрології та гінекології, зокрема для лікування безпліддя [1,2].

Важливими етапом кріоконсервування тканин є відігрів. Як відомо, за умов повільного відтаювання кріоконсервованих біологічних об'єктів можуть відбуватися значні механічні пошкодження їх структури, у тому числі при рекристалізації льоду [3]. Також під час повільного відтавання відбувається підвищення концентрації позаклітинних розчинів. За умов підвищення швидкості відігріву можна уникнути вище зазначених пошкоджень.

Водночас під час заморожування-відігріву в біологічних системах знижується антиоксидантний захист, що призводить до пошкодження цілісності мембран клітин та активізації процесів апоптозу і некрозу [4]. Літературні дані свідчать, що вільні радикали, зокрема супероксид та гідроксид-радикал, можуть бути патогенним чинником у процесі ішемічно-реперфузійних пошкоджень тканини [5]. Вони включають ініціювання перекисного окислення ліпідів (ПОЛ), пряме інгібування мітохондріальних ферментів дихального ланцюга, інактивацію глицеральдегид-3-фосфатдегідрогенази та мембранних натрійових каналів, інгібування АТФазної активності тощо [6]. Саме взаємодія високо реакційного гідроксильного радикалу з атомами гідроґену метильних груп поліненасичених жирних кислот викликає значне пошкодження тканин.

Тому для отримання високих показників морфофункціонального стану клітин після кріоконсервування важливо застосовувати комбінацію ефективних режимів як охолодження, так і відігріву.

Мета роботивизначення впливу режимів відігріву на морфофункціональні характеристики кріоконсервованих сім'яних канальців щурів.

Об'єкт і методи дослідження. Експериментальні дослідження було проведено з дотриманням вимог гуманного ставлення до піддослідних тварин, регламентованих Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (№ 3447-IV від 21.02.2006 р.) та Європейською конвенцією про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.).

Сім'яні канальця отримували механічним шляхом з обох сім'яників статевонезрілих щурів (n=50, масою 50±15 г, віком 7-8 тижнів) та робили навіски масою 75±3 мг.

Кріозахисні розчини виготовляли *ex tempore* на основі фібринового гелю (ФГ), який виділяли із свіжої аутологічної крові тварин. До ФГ додавали гліцерин («Dow Chemical», Німеччина) у кінцевій концентрації 0,7 М. Час експозиції сім'яних канальців у середовищі складав 30 хв. (4°С) [7], після чого кріопробірки («Nunc», США) охолоджували в парах рідкого азоту до –70°С із неконтрольованою швидкістю охолодження впродовж 40 хв. і переносили у рідкий азот (–196°С). Зразки зберігали в умовах кріобанку 1 місяць.

Для відігріву застосовували наступні режими: режим 1 – відігрів при кімнатній температурі (22°С); режим 2 – відігрів на водяній бані при 40°С до появи рідкої фази з попередньою експозицією їх у парах рідкого азоту; режим 3 – відігрів на водяній бані при 50°С до появи рідкої фази з попередньою експозицією їх у парах рідкого азоту. Група порівняння – інтактний контроль (свіжоізольовані фрагменти сім'яних канальців щурів).

Для гістологічних досліджень парафінові зрізи звитих канальців товщиною 7 мкм забарвлювали гематоксиліном і еозином та досліджували під мікроскопом «LSM 510 Meta» («Carl Zeiss», Німеччина). Метаболічну активність досліджували за допомогою МТТ-тесту [8]. Загальну активність лактатдегідрогенази (ЛДГ), системи антиоксидантного захисту (АОЗ), а також вміст загального білку вимірювали на біохімічному аналізаторі ERBA CHEM 7 за допомогою відповідних тест-систем «Randox» (Великобританія). Для проведення тестів зразки тканин гомогенізували та центрифугували (5 хв, 1500 об/хв). Вимірювання оптичної щільності проводили в супернатанті згідно інструкцій фірми-виробника. Розрахунок активності досліджених показників проводили на 1 мг білку.

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. Звиті канальця сім'яників щурів інтактної групи характеризувалися цілісністю сперматогенного епітелію, в якому можна було легко диференціювати сперматогонії, сперматоцити, ранні та пізні сперматиди **(рис. 1, інтакт).** Конденсація ядер сперматогенних клітин зустрічалася рідко та була пов'язана з технології отримання гістопрепаратів.

Після кріоконсервування та відігріву зразків при 22°С **(рис. 1, режим 1)** були виявлені різко виражені

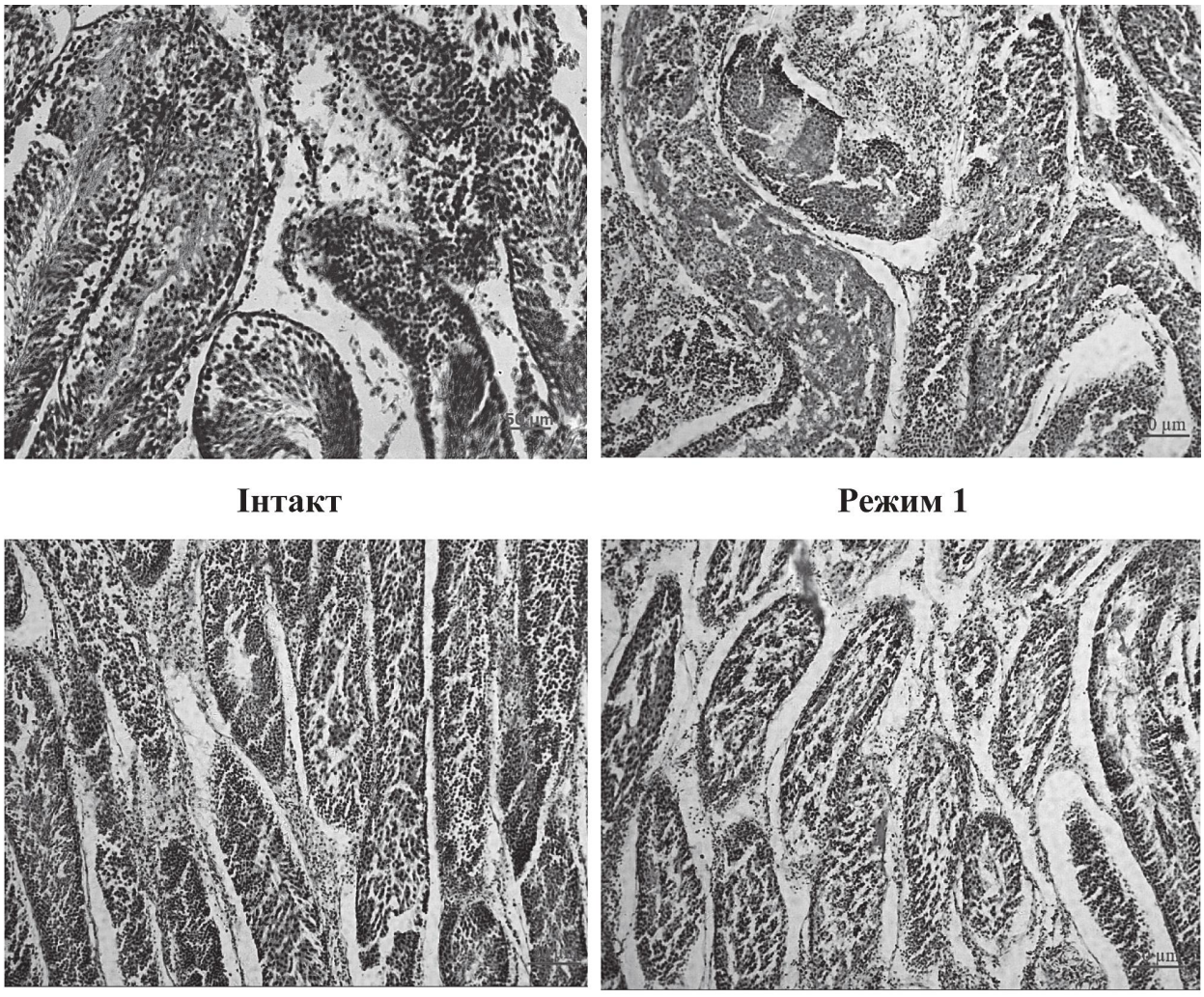

Рисунок 1 – Вплив режимів відігріву на гістоструктуру звитих канальців сім'яників статевонезрілих щурів після кріоконсервування з застосуванням повільних швидкостей охолодження. Світлова мікроскопія; забарвлення гематоксиліном і еозином, збільшення ×150.

гістологічні зміни. Характерна для сперматогенного шару зональність була відсутня. Відбувалася різка ретракція клітин з утворенням великих щілин всередині сперматогенного пласта. Пікноз ядер спостерігався в майже 82,3±5,8% клітин. Візуалізувались осередки некрозу тканини. Десквамація епітелію, у тому числі тотальна, визначалася в 76,4±7,2% канальців.

Відігрів кріоконсервованих зразків за режимом 2 викликав помірні ушкодження гістоструктури сперматогенного епітелію **(рис. 1, режим 2)**. Цілісність звитих канальців сім'яників і архітектура сперматогенного епітелію в цьому випадку були порівнянні з інтактною групою, проте була присутня помірна ретракція клітин та в 30,4±6,2% канальців відбувалась десквамація епітелію. Остання була помірною (частковою) та не набувала тотального характеру. Пікноз ядер виявлявся у 25,4±7,5% клітин.

Після відігріву при 50°С **(рис. 1, режим 3)** виявлялись виражена ретракція клітин сперматогенного епітелію та його тотальна десквамація. Загалом десквамація епітелію відбувалася в 65,1±7,3% досліджених канальців. Явища пікнозу спостерігались у 43,8±6,8% клітин, тобто в 1,7 раз частіше ніж після відігріву за умов 40°С.

Середня щільність клітин сперматогенного епітелію була зниженою відносно інтакту при всіх варіантах відігріву **(рис. 2А).** Проте після відігріву при температурі 40°С (режим 2) цей показник майже не зазнавав змін. Порівняно з цим варіантом відігрів за режимами 1 та 3 виявився відповідно у 2,1 та 1,3 разів менш ефективнішим.

Метаболічна активність за МТТ-тестом **(рис. 2Б)** та загальна активність ЛДГ **(рис. 2В)** були максимально збережені за умов відігріву при температурі 40°С, хоча і не досягали інтактного рівня. Найменш перспективним виявився режим 1, де ці показники були відповідно у 2,1 та 1,8 разів нижчими за інтактний контроль. Загалом результати цих методів дослідження корелюють з даними гістоморфометрії, що свідчить про збереження як структури, так і функціональної активності клітини сперматогенного епітелію після заморожування-відігріву.

Загальна активність АОЗ **(рис. 2Г)** зазнавала порівняно однакових змін після відігріву як за режимом 2, так і за режимом 3 (порівняно з інтактним контролем вона знижувалась в 1,4 та 1,5 разів відповідно). Режим 1 призводив до більш значної втрати активності АОЗ (у 2,3 рази порівняно з інтактною групою).

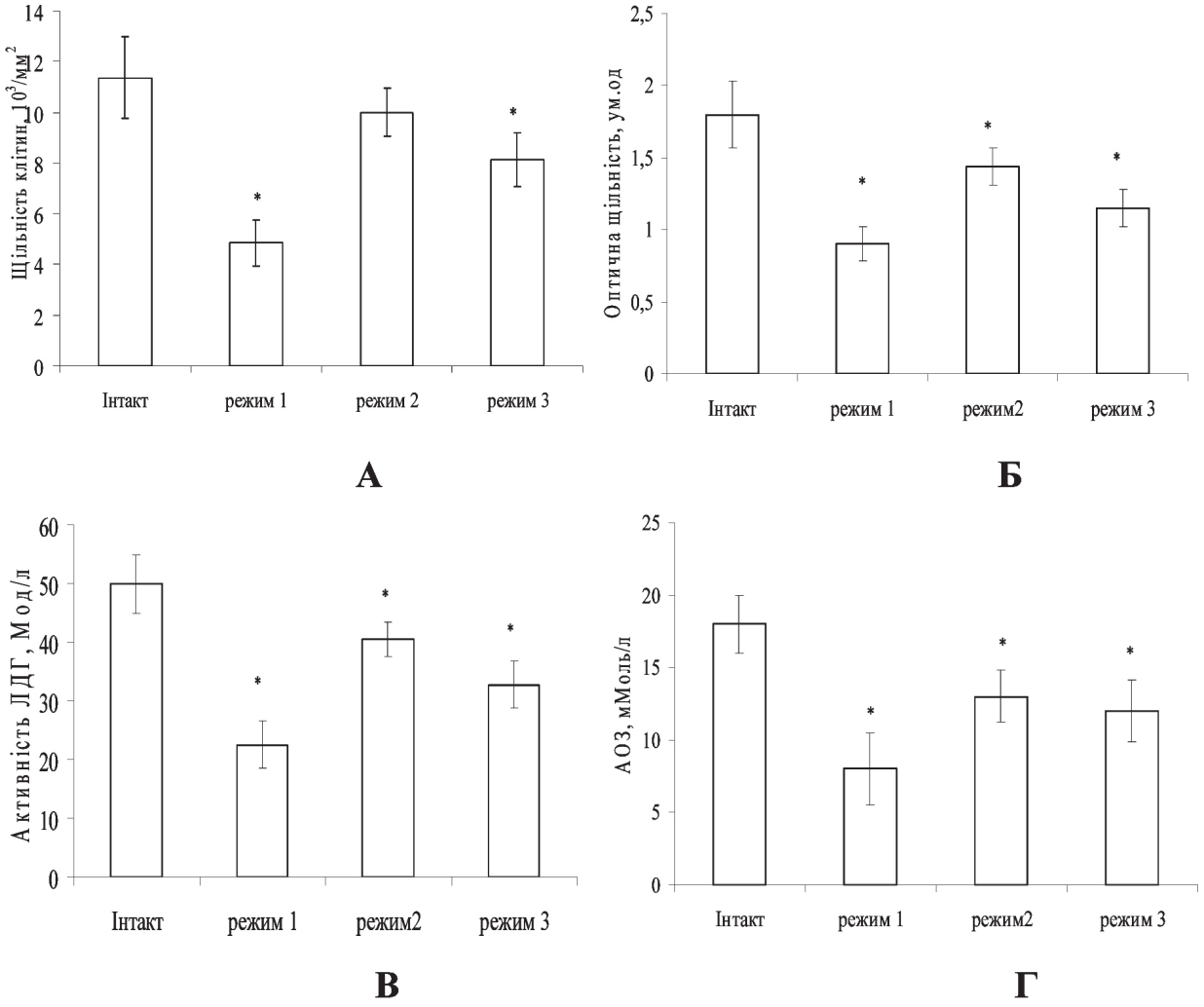

Рисунок 2 – Середня щільність клітин (А), оптична щільність розчину формазану в МТТ-тесті (Б), загальна активність ЛДГ (В) та загальна активність системи АОЗ (Г) в кріоконсервованих звитих канальцях сім'яників після різних режимів відігріву.
Примітка: * – різниця вірогідна відносно інтактного контролю (p<0,05; n=5).

Відомо, що повільне відтаювання кріоконсервованих біологічних об'єктів може призводити до значних механічних пошкоджень їх структури за рахунок підвищення концентрації позаклітинних розчинів. У зоні фазових переходів спостерігається рекристалізація, яку також відносять до ушкоджуючих чинників кріоконсервування. Під час відігріву кріоконсервованих зразків процес відтаювання відбувається з різною швидкістю. За умов підвищення останньої можна уникнути вище зазначених пошкоджень. Для отримання високих показників морфофункціонального стану клітин після кріоконсервування важливо дотримуватися ефективного співвідношення режимів охолодження та нагріву.

На сьогодні, окислювальний стрес вважається однією з основних причин чоловічого безпліддя через його шкідливий вплив на статеві клітини, що розвиваються та безпосередньо на функцію сперматозоїдів. Він впливає на процеси проліферації і диференціювання клітин сперматогенного епітелію, порушує стероїдогенез в клітинах Лейдіга, викликає загибель чоловічих статевих клітин і ендокриноцитів сім'яників шляхом апоптозу, приводячи до зниження їх чисельності та функціональної активності [9]. Про/антиоксидантний дисбаланс може призвести до пошкодження структури спермія і таких макромолекул, як компоненти цитоплазматичної мембрани, білки, ферменти та ДНК [10]. На сьогодні існує достатня кількість робіт, присвячених ролі антиоксидантів у відновленні чоловічої фертильності [11]. Саме тому, при кріоконсервуванні звитих канальців сім'яників важливим є збереження активності АОЗ, що в нашому дослідженні найкраще досягалося під час використання режимів відігріву 2 та 3. Але враховуючи результати морфометрії та метаболічної активності лише режим 2 слід вважати більш перспективним для кріоконсервування сім'яних канальців статевонезрілих щурів з використанням повільного охолодження.

Висновки. Використання режиму відігріву на водяній бані при 40°С з попередньою експозицією зразків у парах рідкого азоту дозволяє ефективно зберегти морфофункціональні властивості тканини звитих канальців сім'яників щурів кріоконсервованих з використанням повільних швидкостей охолодження.

Перспективи подальших досліджень. Отримані дані можуть бути використані для обґрунтування та розробки ефективних протоколів кріоконсервування звитих канальців сім'яників для збереження фертильності хлопчиків препубертатного віку, яким показана гонадотоксична терапія.

Література

1. Easley C, Simerly C, Schatten G. Stem cell therapeutic possibilities: future therapeutic options for male-factor and female-factor infertility? Reprod Biomed Online [Internet]. 2013 Mar [cited 2020 May 12];27(1):75-80. Available from: https://www.rbmojournal.com/article/S1472-6483(13)00129-6/fulltext
2. Volkova NA, Yukhta MS, Yurchuk TA, Ivanova ED, Stepanuk LV, Pavlovich EV, Sokol LV. Multipotent mesenchymal stromal cells of bone marrow in therapy of chronic inflammation of murine ovaries. Biotechnologia Acta. 2014;7(5):35-42.
3. 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.
4. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 2000;408:239-47.
5. Amani H, Habibey R, Hajimiresmail SJ, Latifi S, Latifi S, Pazoki-Toroudi H, Akhavan O. Antioxidant nanomaterials in advanced diagnoses and treatments of ischemia reperfusion injuries. J Mater Chem. B. 2017;5:9452.
6. Lintz JA, Dalio MB, Joviliano EE, Piccinato CE. Ischemic pre and postconditioning in skeletal muscle injury produced by ischemia and reperfusion in rats. Acta Cir Bras. 2017;28(6):441.
7. 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.
8. 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.
9. Nagamatsu G, Katsuhiko H. Stem cells, in vitro gametogenesis and male fertility. Reproduction. 2017;154(6):F79-F91.
10. Majzoub A, Agarwal A. Systematic review of antioxidant types and doses in male infertility: Benefits on semen parameters, advanced sperm function, assisted reproduction and live-birth rate. Arab J Urol. 2018;16(1):113-24.
11. Syazili M, Hanif F. The protective effect of phizophora apiculata bark extract against testicular damage induced by cigarette smoke in male rats. ActaBiolna. 2019;2(1):23-31.

ВПЛИВ РЕЖИМІВ ВІДІГРІВУ НА МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН КРІОКОНСЕРВОВАНИХ ЗВИТИХ КАНАЛЬЦІВ СІМ'ЯНИКІВ

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

Резюме. У роботі проведено порівняльну оцінку впливу різних режимів відігріву на морфофункціональні характеристики сім'яних канальців статевонезрілих щурів після кріоконсервування з використанням повільних швидкостей охолодження до –70°С впродовж 40 хв. з наступним зануренням у рідкий азот. На основі результатів аналізу показників загальної активності ЛДГ, системи АОЗ, МТТ-тесту та гістоморфометричних даних встановлено, що для зразків звитих канальців сім'яників статевонезрілих щурів кріоконсервованих з неконтрольованою повільною швидкістю охолодження оптимальним режимом відігріву є водяна баня при 40°С з попередньою інкубацією їх у парах рідкого азоту.

Ключові слова: сім'яні канальця, статевонезрілі щури, кріоконсервування, відігрів, метаболічна активність, антиоксидантний захист.

ВЛИЯНИЕ РЕЖИМОВ ОТОГРЕВА НА МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КРИОКОНСЕРВИРОВАННЫХ ИЗВИТЫХ КАНАЛЬЦЕВ СЕМЕННИКОВ

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

Резюме. В работе проведена сравнительная оценка влияния различных режимов отогрева на морфофункциональные характеристики семенных канальцев неполовозрелых крыс после криоконсервирования с использованием медленных скоростей охлаждения до -70°С в течение 40 мин с последующим погружением жидкий азот. На основе результатов анализа показателей общей активности ЛДГ, системы АОЗ, МТТ-теста и гистоморфометрических данных установлено, что для образцов извитых канальцев семенников неполовозрелых крыс криоконсервированных с неконтролируемой медленной скоростью охлаждения оптимальным режимом отогрева является водяная баня при 40°С с предварительной инкубацией их в парах жидкого азота.

Ключевые слова: семенные канальца, неполовозрелые крысы, криоконсервирование, отогрев, метаболическая активность, антиоксидантная защита.

INFLUENCE OF THAWING REGIMES ON MORPHOFUNCTIONAL STATE OF CRYOPRESERVED SEMINIFEROUS TUBULES OF TESTES

Volkova N. O., Yukhta M. S., Chernyshenko L. G., Stepanyuk L. V., Sokil L. V., Goltsev A. M.

Abstract. It is important to use a combination of effective modes of both cooling and thawing to obtain high rates of morphofunctional state of cells after cryopreservation.

The aim of the study was a comparative assessment of the thawing regimes on the morphofunctional characteristics of the rat seminiferous tubules after cryopreservation with a slow uncontrolled cooling rate.

Object and methods. Samples of seminiferous tubules were obtained mechanically from both testes of immature rats (n=50, weighing 50±15 g, aged 7-8 weeks), incubated in cryopreservation media (fibrin gel with 0,7M glycerin) for 30 min (4°C) and freezed using slow uncontrolled cooling to -70°C for 40 min followed by immersion in liquid nitrogen. The following regimes were used for thawing: Ithawing at room temperature (22°C); IIpre-incubation in liquid nitrogen vapor and thawing in a water bath at 40°C; IIIpre-incubation in liquid nitrogen vapor and thawing in a water bath at 50°C. Intact control was used as a comparison group. The histological structure and the metabolic activity (MTT test, LDH and activity of antioxidant defense systems) of spermatogenic epithelium cells was evaluated.

Results. After freezing and thawing at 22°C pronounced histological changes were detected. The specific zonation of the spermatogenic layer was absent; a sharp retraction of cells, foci of epithelial destruction and necrosis were detected. Pycnosis was observed in almost 82,3±5,8% of cells. Desquamation of the epithelium, including total, was determined in 76,4±7,2% of the studied tubules. Thawing of cryopreserved samples in a bath with a water temperature of 40°C caused moderate damage to the histostructure: moderate cell retraction; partial epithelium desquamation in 30% of the tubules; pycnosis in 25,4±7,5% of cells. After thawing at 50°C pronounced retraction of

spermatogenic epithelial cells and its total desquamation was detected in 65,1±7,3% of the studied tubules. Pycnosis were observed in 43,8±6,8% of cells.

The average density of spermatogenic epithelial cells was reduced relative to intact in all studied groups. However, this indicator underwent the smallest changes after thawing at a temperature of 40°C. In comparison, thawing at 22°C and 50°C was in 2.1 and 1.3 times less efficient, respectively.

The results of the study of the functional characteristics of the seminiferous tubules showed that the indicators of metabolic activity (MTT test, LDH and activity of antioxidant defense systems) in the samples thawed by II regime were higher than by regimes I and III. However, in all studied groups, the functional parameters after freezing-thawing remained significantly lower than in intact control.

Conclusion. The thawing in a water bath at 40°C with pre-incubation of samples in liquid nitrogen vapor allows effective preserving the morphofunctional properties of cryopreserved seminiferous tubules.

Key words: seminiferous tubules, immature rats, cryopreservation, thawing, metabolic activity, antioxidant protection.

Рецензент – проф. Білаш С. М.
Стаття надійшла 09.05.2020 року

DOI 10.29254/2077-4214-2020-2-156-253-256
УДК [611.631- 612.616+616.981]:612.273.2

Гнатюк М. С., Коноваленко С. О., Татарчук Л. В.

МОРФОМЕТРИЧНА ОЦІНКА ОСОБЛИВОСТЕЙ РЕМОДЕЛЮВАННЯ АРТЕРІЙ СІМ'ЯНИКІВ ПРИ ДІЇ НА ОРГАНІЗМ КАДМІЮ ХЛОРИДУ

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України (м. Тернопіль)

hnatjuk@tdmu.edu.ua

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами. Робота є фрагментом науково-дослідної роботи Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України «Структурно-функціональні основи адаптації серцево-судинної системи при дії на організм токсичних факторів» (№ державної реєстрації 0114U 4004522).

Вступ. Сьогодні спостерігається зростання техногенного навантаження на довкілля, в результаті чого в ньому зростає кількість хімічних речовин та їхніх метаболітів, які можуть негативно впливати на органи і системи організму та погіршувати перебіг різних патологій [1]. Особливо шкідливими для живих організмів є солі важких металів, до яких відноситься кадмію хлорид. Репродуктивна система у чоловіків при цьому може ускладнитися азооспермією (відсутність сперматозоїдів в еякуляті) [2,3]. Останніми десятиріччями показники репродуктивного і сексуального здоров'я чоловіків знижуються у багатьох країнах світу, але в Україні вони мають стрімку вкрай негативну тенденцію [2,4,5,6]. Сучасні дослідники підкреслюють недооцінку негативного впливу факторів довкілля на генеративну функцію у чоловіків [2].

Відомо, що артеріальне русло відіграє важливу роль у повноцінному кровопостачанні органів та їхньому функціонуванні. Порушення кровопостачання органів та систем ускладнюється гіпоксією, дистрофією та некробіозом клітини та тканин [4,5,6]. Необхідно вказати, що структурні зміни артерій сім'яників при дії на організм кадмію хлориду майже не досліджувалися.

Мета дослідження – морфометрично вивчити особливості ремоделювання артерій сім'яників при дії на організм кадмію хлориду.

Об'єкт і методи дослідження. Комплексом морфологічних методів вивчено артерії сім'яників 60 лабораторних статевозрілих білих щурів-самців, які були розділені на 2-і групи. 1-а група нараховувала 30 інтактних тварин, які знаходилися у звичайних умовах віварію, 2-а – 30 щурів, яким підшкірно вводили хлорид кадмію в дозі 6 мг/кг впродовж 4-х тижнів [7]. Через 30 діб від початку експерименту проводили евтаназію дослідних тварин кровопусканням в умовах тіопенталового наркозу. Вирізали шматочки із лівого та правого сім'яників, які фіксували у 10% нейтральному розчині формаліну і після проведення через спирти зростаючої концентрації поміщали у парафін. Мікротомні зрізи товщиною 5-7 мкм після депарафінізації забарвлювали гематоксилін-еозином, за ван-Гізон, Маллорі, Вейгертом, толуїдиновим синім [8]. Морфометрично у лівому (ЛС) та правому (ПС) сім'яниках дослідних тварин вивчали артерії дрібного калібру (зовнішній діаметр 26-50 мкм) [9]. При цьому вимірювали зовнішній (ДЗ) і внутрішній (ДВ) діаметри судин, товщину медії (ТМ), індекс Керногана – ІК (відношення площі просвіту до площі судини), висоту ендотеліоцитів (ВЕ), діаметр їх ядер (ДЯ), ядерно-цитоплазматичні відношення в ендотеліоцитах (ЯЦВ), відносний об'єм ушкоджених ендотеліоцитів (ВОПЕ) [9,10]. При морфометричних дослідженнях використовували програму «Відео-Test-5,0». Кількісні показники обробляли статистично, що проведено у відділі системних статистичних досліджень Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України. Різницю між порівнювальними морфометричними параметрами визначали за критеріями Манна-Уітні і Стьюдента [10,11]. Усі маніпуляції та евтаназію щурів проводили з дотриманням основних принципів роботи з експериментальними тваринами у відповідності з положенням «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» (Страсбург, 1986 р.), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених